

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



PARASITISMO GASTROINTESTINAL EM ASININOS DA RAÇA DE MIRANDA.
EPIDEMIOLOGIA E CONTROLO SELETIVO DA INFECÇÃO POR ESTRONGILÍDEOS

SÉRGIO EDUARDO RAMALHO DE SOUSA

Orientadores: Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutor Adolfo Paz-Silva

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na
Especialidade de Sanidade Animal

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



PARASITISMO GASTROINTESTINAL EM ASININOS DA RAÇA DE MIRANDA.
EPIDEMIOLOGIA E CONTROLO SELETIVO DA INFEÇÃO POR ESTRONGILÍDEOS

SÉRGIO EDUARDO RAMALHO DE SOUSA

Orientadores: Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutor Adolfo Paz-Silva

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na
Especialidade de Sanidade Animal

Júri:

Presidente: Doutor Rui Manuel de Vasconcelos e Horta Caldeira

Vogais:

- Doutor Adolfo Paz-Silva
- Doutor Virgílio da Silva Almeida
- Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
- Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles
- Doutora Ludovina Neto Padre
- Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes

Á Sofia e aos meus filhos, Duarte e Dinis.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, a minha profunda admiração e gratidão pelo apoio e incentivo nos momentos mais críticos e por todos os ensinamentos transmitidos. Agradeço a sua disponibilidade para a orientação deste trabalho e a confiança depositada durante a sua elaboração. Agradeço ainda a amizade e o privilégio de ser seu orientando num já longo percurso de trabalho conjunto na procura de uma “estratégia integrada e seletiva do controlo de parasitas de asininos”. Apresento o meu sincero reconhecimento.

Ao Professor Doutor Adolfo Paz Silva, agradeço profundamente a sua disponibilidade para a co-orientação deste trabalho assim como a amizade e dedicação manifestada ao longo da sua realização. Apresento o meu reconhecimento pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), na pessoa do seu Coordenador, Professor Doutor Luís Lopes da Costa, agradeço pela possibilidade de fazer parte deste Centro que sempre incentivou e disponibilizou as condições necessárias à realização deste trabalho.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), agradeço a atribuição da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/65407/2009) que financiou este estudo.

Um agradecimento muito especial à Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino (AEPGA), em particular ao meu colega e amigo Miguel Nóvoa, por toda a disponibilidade e colaboração prestada no trabalho de campo sem a qual este trabalho não teria sido possível.

À Associação Cognitaria São Jorge de Milreu (SCSJM), na pessoa do seu Secretário Geral, Sr. Luiz Vilar, agradeço as condições proporcionadas para a realização destas Provas de Doutoramento.

À Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), na pessoa do Presidente do Conselho de Direção, Professor Doutor Humberto Rocha, agradeço a possibilidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Científico da Escola Universitária Vasco da Gama, na pessoa da sua Presidente, Professora Doutora Anabela Almeida, agradeço o apoio demonstrado na conclusão destas Provas Doutoramento.

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Escola Universitária Vasco da Gama, na pessoa da Diretora, Professora Doutora Sofia Duarte, o meu sincero reconhecimento pelo incentivo e apoio demonstrados para a realização e conclusão deste trabalho.

Aos alunos da Escola Universitária Vasco da Gama, agradeço o entusiasmo e a constante motivação que renovam a minha vontade de crescer e aprender, nesta cruzada diária, desconcertante e compensadora, de partilha e dedicação.

Um agradecimento muito especial aos alunos que partilham comigo o gosto pelo estudo dos parasitas, em particular a aqueles que nos seus trabalhos e estágios colaboram com o estudo da biodiversidade parasitária dos asininos em Portugal. A todos o meu muito obrigado.

À Professora Doutora Maria do Ceu Sousa, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, agradeço a sua amizade e simpatia permanentemente demonstradas ao longo da realização deste trabalho.

Um agradecimento muito especial à Professora Doutora Maria Manuela Rodrigues, pela amizade e por ter permitido o início da nossa atividade na área da Parasitologia e Doenças Parasitárias na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. O meu sincero agradecimento e reconhecimento.

Aos Professores Doutores Odete Almeida e Carlos Pires, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por nos dedicarem um carinho especial e por todos os conhecimentos transmitidos que sempre acompanharam a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Anália do Carmo, agradeço a sua amizade incondicional e dedicação inesgotável. Agradeço ainda as palavras de incentivo e os conselhos que inconscientemente se tornaram importantes para a realização deste trabalho.

Ao Francisco Viana, agradeço a camaradagem e a energia motivadora que sempre me dedicou.

À Sónia agradeço pela amizade incondicional sempre manifestada, em particular na realização dos nossos estudos parasitológicos, no início da nossa atividade académica. O meu muito obrigado.

À Teresa Coutinho, técnica do Laboratório de Parasitologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, agradeço a constante amizade demonstrada desde o início da nossa formação académica. O meu muito obrigado.

À Paula Amaral, funcionária dos Laboratórios da Escola Universitária Vasco da Gama, agradeço a simpatia, disponibilidade e dedicação, refletidas na prontidão de resposta às repetidas solicitações de apoio ao laboratório durante a realização da componente prática deste trabalho.

Ao Sr. Seco e D. Luísa, técnicos dos Laboratórios da Escola Universitária Vasco da Gama, agradeço a constante disponibilidade e amizade demonstradas ao longo de todo este tempo de convívio.

À D. Fátima Fraga, técnica do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, agradeço pelos testemunhos de rigor, método e trabalho metódico, transmitidos durante a realização do estágio final do Curso de Medicina Veterinária. Valores sempre presentes nos nossos estudos parasitológicos e em particular durante a realização deste trabalho. O meu sincero reconhecimento.

Aos Colegas e Amigos Sara Mora, João Rodrigues e Miguel Quaresma, agradeço a colaboração, honestidade e disponibilidade sempre demonstradas ao longo de todos estes anos de convívio e partilha pelo estudo da biodiversidade parasitária dos burros da Raça Asinina de Miranda.

Ao Ricardo Cabeças, um agradecimento muito especial pelo apoio e paciência demonstrados durante a realização do tratamento estatístico deste trabalho. O meu profundo reconhecimento pela amizade e ajuda nos bons e maus momentos.

Aos meus amigos e colegas da Escola Universitária Vasco da Gama, agradeço o apoio e incentivo que me proporcionam. Um agradecimento muito especial aos que me acompanham ao longo destes últimos treze anos, de profundo envolvimento construtivo em projetos de que

acreditamos. Agradeço à Anabela pela serenidade, à Carla pelo companheirismo, à Liliana pela espontaneidade, à Sofia pela astúcia e perspicácia, à Sofia Duarte pelo exemplo e à Teresa pela diferença.

Dedico um especial carinho ao meu primo Silva que “vinha a Portugal buscar o burrinho”! Agradeço a sua feliz e terna memória.

Uma pequena mas muito sentida homenagem aos avós maternos, Sara e João Ramalho, e paternos, Elvira e José de Sousa, por todos os seus exemplos e ensinamentos.

À minha família em geral, agradeço pelo privilégio de sermos muitos e unidos. Agradeço ainda o carinho, a dedicação e a motivação, sempre incondicionais, que em todos os momentos acompanharam a realização deste trabalho. O meu sincero obrigado.

Um especial agradecimento aos meus padrinhos, Lucília Ramalho e Sérgio Sousa, pelo afeto e presença sempre constantes.

Aos meus queridos pais, Luz e Renato, agradeço a partilha e dedicação, e pelo privilégio de tantos momentos de felicidade. Obrigado por acreditarem.

Um especial e profundo agradecimento aos meus queridos irmãos, Ciete e César, e sobrinhos, Íris, Daniel e Dário, por tudo o que são e por tudo o que representam.

Dedico um reconhecimento muito especial à Sofia pelo amor, dedicação e por comigo partilhar sonhos nesta aventura quotidiana de estarmos juntos nos bons e maus momentos.

Aos meus filhos, Duarte e Dinis, dedico-me com o mais profundo agradecimento por todos os momentos de convívio e partilha que nos permitem sonhar e acreditar num mundo melhor.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o nosso sincero muito obrigado e Bem Hajam.

Este trabalho foi apoiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através da atribuição da Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/65407/2009).

Parasitismo gastrointestinal em asininos da Raça de Miranda. Epidemiologia e controlo seletivo da infeção por strongilídeos.

RESUMO

Em Portugal os equídeos apresentam um parasitismo caracterizado por cargas parasitárias e biodiversidade helmíntica elevadas, fatores potencialmente muito patogénicos para os seus hospedeiros. Considerando o reduzido efetivo de asininos existente no nosso país e a escassa informação disponível sobre o seu parasitismo, foi considerado este estudo epidemiológico com o objetivo geral de contribuir para o estudo e proteção do gado asinino em Portugal, e em particular da Raça Asinina de Miranda no Planalto Mirandês. Assim, com este trabalho pretendeu-se observar o estatuto parasitológico desta população de asininos de forma a contribuir para um melhor conhecimento do parasitismo gastrointestinal envolvido, em particular os strongilídeos, e da adoção de medidas terapêuticas adequadas.

Considerando a realização de técnicas parasitárias adequadas para o estudo epidemiológico do parasitismo gastrointestinal em equídeos, este trabalho pretendeu observar o nível de infeção e biodiversidade parasitária no hospedeiro assim como observar a contaminação ambiental. Durante cinco anos procedeu-se à monitorização de uma população de 62 asininos sujeitos ao controlo seletivo, no solar da Raça Asinina de Miranda.

O estudo observou uma diminuição da taxa de prevalência média anual de infeção por strongilídeos gastrointestinais, de 35,1% para 23,0%, evidenciando uma distribuição do tipo binominal negativa dos strongilídeos parasitas de asininos sujeitos ao controlo anti-helmíntico seletivo. A taxa de prevalência de infeção foi superior nas fêmeas (39,5%), em animais com idade inferior a quatro anos (46,7%) e com menor condição corporal (40,8%). Ocorreu maior excreção de ovos nos jovens (901,6 OPG) e nas fêmeas (779,9 OPG) assim como maior média da frequência de novas infeções nas fêmeas (6,9). Durante o estudo, observou-se um número médio de desparasitações maior nas fêmeas (3,3) do que em machos (2,7) e intervalos médios entre desparasitações de 16,2 meses (fêmeas) e de 22,4 meses (machos).

Este estudo evidenciou o papel dos lameiros e da influência climática na epidemiologia da strongilidose asinina no Planalto Mirandês e permitiu observar a curva anual de excreção de ovos de strongilídeos parasitas de asininos desta região transmontana, verificando-se um aumento progressivo de dezembro até junho, mês que se atinge um pico máximo na eliminação de ovos, decrescendo depois progressivamente até dezembro.

Foi observada uma baixa biodiversidade de parasitas gastrointestinais, sendo *Cyathostomum* sensu lato o género mais prevalente com ocorrência dos morfotipos A (35,0 a 85,7%) e D (15,6 a 30,8%), C (15,7 a 15,2%), G (11,0 a 12,1%) e B (8,7 a 9,1%), E (2,2 a 1,5%), F (2,2 a 1,6%) e H (0,8%). *Strongylus vulgaris* (2,0%) foi o strongilíneo mais observado. *Trichostrongylus axei* (0,8%) e *Parascaris* sp. (0,8%) foram outros dos nematodes observados. Em sùmula, verificou-se uma elevada prevalência de parasitismo por strongilídeos que foi diminuindo progressivamente ao longo do estudo assim como a biodiversidade, sendo os ciatostomíneos os mais prevalentes. O controlo anti-helmíntico seletivo permite utilizar os recursos disponíveis com maior racionalidade, revelando-se uma estratégia com eficácia no controlo dos strongilídeos e outros parasitas gastrointestinais de asininos.

Palavras-chave:

Asininos da Raça de Miranda, controlo seletivo, Strongylidae, Cyathostominae, Portugal

Gastrointestinal parasitism in Miranda donkeys. Epidemiology and selective control of strongyles infection.

ABSTRACT

In Portugal equine parasitism is characterized by high parasitic burdens and high helminthic biodiversity, both factors potentially high pathogenic for their hosts. Considering the reduced donkey numbers in our country, and the scarce information available regarding their parasitism, we considered this epidemiologic study with the general goal of contributing to the study and protection of donkey population in Portugal, particularly the Miranda donkey breed in the Miranda do Douro highland. Hence, the current work intends to assess the parasitological status of this donkey population in order to contribute to a better knowledge of the involved gastrointestinal parasitology, particularly strongyles, and to evaluate the adoption of adequate therapeutic measures.

Considering the use of adequate parasitological techniques for the epidemiologic study of gastrointestinal parasitism in equines, this work sought to observe the prevalence, levels of infection and the host parasitic biodiversity, as well as the environmental contamination. During a period of five years a population of 62 donkeys were selectively dewormed and regularly monitored in the home region of Miranda Donkey breed.

The study observed a reduction of the average annual prevalence rate of infection by gastrointestinal strongyles from 35,1% to 23,0%, showing a negative binomial distribution of parasitic strongyles in asinines subjected to selective anthelmintic control. The prevalence rate of infection was higher in females (39,5%), in animals with less than 4 years of age (46,7%) and in those physically less fit (40,8%). There was a higher egg shedding in younger animals (901,6 eggs per gram, EPG) and in females (779,9 EPG), as well as a higher average rate of new infection in females (6,9). During the study there was a higher average number of dewormings in females (3,3) than in males (2,7) and an average interval between dewormings of 16,2 months (females) and 22,4 months (males).

This study revealed the role of sloughs and of the climatic influence in the epidemiology of donkey strongylidosis in the Miranda do Douro highland and allowed perceiving the annual epidemiological curve of donkey strongyle egg shedding in this region, with a progressive increase from December to July, when a maximum peak of egg elimination is attained, which then decreases progressively until December.

A low biodiversity of gastrointestinal parasites was observed, with *Cyathostomum* sensu lato being the most prevalent genus, showing occurrence of the morphotypes A (35,0-85,7%) and D (15,6-30,8%), C (15,7-15,2%), G (11,0-12,1%) and B (8,7-9,1%), E (2,2-1,5%), F (2,2-1,6%) and H (0,8%). *Strongylus vulgaris* (2,0%) was the most commonly observed strongyles. *Trichostrongylus axei* (0,8%) and *Parascaris* sp. (0,8%) where other two nematodes also observed.

In summary, there was a high prevalence of parasitism by strongyles that progressively diminished throughout the study, as well as their biodiversity, with cyathostomins being the most prevalent. Targeted selective treatment allows a more rational use of available resources in anthelmintic control, revealing efficacy in the control of donkey strongyle and other gastrointestinal parasites.

Keywords:

Miranda donkeys, targeted selective treatment, Strongylidae, Cyathostominae, Portugal

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA DOS ASININOS	4
1.1. Origem dos asininos domésticos	4
1.2. Distribuição geográfica da população de asininos	5
1.2.1. No mundo	5
1.2.2. Em Portugal	6
<i>Na região de Trás-os-Montes</i>	7
1.3. Importância do gado asinino	8
1.3.1. No mundo	8
1.3.2. Em Portugal	10
<i>Em Trás-os-Montes</i>	10
2. PARASITISMO GASTROINTESTINAL POR HELMINTES EM ASININOS	12
3. SISTEMÁTICA E TAXONOMIA DOS ESTRONGILÍDEOS	14
4. BIOLOGIA E PATOGENIA DA INFECÇÃO POR ESTRONGILÍDEOS	17
4.1. Aspectos biológicos	17
4.1.1. Ciclo biológico	17
<i>Desenvolvimento exógeno</i>	17
<i>Desenvolvimento endógeno</i>	21
4.1.2. Subfamília Strongylinae, os grandes estrongilídeos	22
<i>Strongylus vulgaris</i>	22
<i>Strongylus equinus</i>	23
<i>Strongylus edentatus</i>	24
<i>Géneros Triodontophorus, Oesophagodontus e Craterostomum</i>	24
4.1.3. Subfamília Cyathostominae, os pequenos estrongilídeos	25
4.2. Patologia e clínica	27
4.2.1. Infecção por estrongilídeos	27
4.2.1.1. Subfamília Strongylinae	28
<i>Strongylus vulgaris</i>	28
<i>Strongylus equinus</i>	29
<i>Strongylus edentatus</i>	29
4.2.1.2. Subfamília Cyathostominae	29
5. IMPORTÂNCIA DAS PARASIToses GASTROINTESTINAIS EM ASININOS	31
5.1. Aspectos Epidemiológicos da estrongilidose asinina	34
5.1.1. Estrongilidose asinina em Portugal	41

5.1.2. Aspetos relacionados com a alteração climática global	43
6. CONTROLO DA ESTRONGILIDOSE EM ASININOS	46
6.1. Estratégias de controlo	46
6.2. Mudança de paradigma	47
6.2.1. Controlo seletivo	48
<i>Métodos diagnósticos utilizados</i>	51
6.2.2. Controlo integrado e sustentável	52
6.3. Utilização de anti-helmínticos em asininos	57
6.3.1. Resistências aos anti-helmínticos	60
7. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS	62
7.1. Localização dos ensaios	62
7.1.1. O Planalto Mirandês	63
7.1.1.1. Caracterização geomorfológica	63
7.1.1.2. Caracterização climática	64
7.1.1.3. Caracterização florística	64
7.1.1.3.1. Lameiros	65
<i>Pastoreio</i>	65
7.1.1.3.2. Campos cultivados	66
7.1.1.3.3. Bosques	67
7.2. Raça Asinina de Miranda	67
7.2.1. Origem	68
7.2.2. Características distintivas	68
7.3. Técnicas parasitológicas	69
7.3.1. Parasitismo e biodiversidade por técnicas coprológicas	69
7.3.1.1. Colheita de fezes	69
7.3.1.2. Conservação das fezes	70
7.3.1.3. Envio da amostra fecal ao laboratório	71
7.3.1.4. Procedimento geral dos exames fecais	71
7.3.1.4.1. Exame macroscópico	71
7.3.1.4.2. Exame microscópico	72
<i>Fezes frescas</i>	72
<i>Exames fecais de concentração ou enriquecimento</i>	72
<i>Métodos de sedimentação</i>	73
<i>Métodos de flutuação</i>	73
7.3.1.4.3. Coprologia qualitativa	74
<i>Limitações</i>	75

7.3.1.4.4. Coprologia quantitativa	75
<i>Limitações</i>	76
<i>Método de McMaster modificado</i>	78
7.3.1.5. Coprocultura	80
7.3.1.5.1. Cultivo de fezes	81
7.3.1.5.2. Recolha de larvas	82
<i>Aparelho de Baermann</i>	82
<i>Copo cónico</i>	82
<i>Placa de Petri</i>	83
7.3.1.5.3. Observação e identificação das larvas infetantes	83
7.3.2. Contaminação por strongilídeos no ambiente	85
7.3.2.1. Estudo quantitativo da biodiversidade de larvas infetantes na pastagem	85
7.3.2.1.1. Amostragem de erva na pastagem	85
7.3.2.1.2. Conservação de erva na pastagem	85
7.3.2.1.3. Extração das larvas infetantes	86
7.3.2.1.3. Conservação e contagem das larvas infetantes	87
7.3.2.2. Estudo quantitativo da contaminação dos estábulos	88
7.3.2.2.1. Método de amostragem e colheita	88
7.3.2.2.2. Determinação do nível de contaminação das camas e da alimentação	88
III. TRABALHO EXPERIMENTAL	89
Estudo epidemiológico do parasitismo por strongilídeos em asininos da Raça de Miranda	89
1. INTRODUÇÃO	89
2. OBJETIVOS	90
3. DESENHO EXPERIMENTAL	91
4. MATERIAL E MÉTODOS	91
4.1. Inquéritos epidemiológicos	92
4.1.1. Caracterização da área de estudo	93
<i>Caracterização dos centros de recuperação da AEPGA</i>	93
<i>Sistema de criação e manejo</i>	95
4.2. Alteração do controlo anti-helmítico estratégico para controlo anti-helmítico seletivo	95
4.3. Estudo do parasitismo por strongilídeos parasitas intestinais de asininos	96
4.3.1. Amostragem e colheita de fezes	96
4.3.2. Determinar a taxa de prevalência de infeção parasitária	97
<i>Coprologia quantitativa</i>	97
4.3.3. Determinar o nível de infeção parasitária dos animais	99
4.3.4. Avaliar a biodiversidade parasitária	99
<i>Culturas fecais ou coproculturas</i>	100

<i>Recolha de larvas infetantes</i>	100
<i>Identificação das larvas infetantes</i>	101
4.4. Estudo da contaminação ambiental por strongilídeos	102
4.4.1. Estudo da biodiversidade de larvas infetantes de strongilídeos na pastagem	102
<i>Amostragem</i>	102
<i>Extração</i>	103
<i>Identificação</i>	104
<i>Quantificação</i>	104
4.4.2. Estudo da contaminação do estábulo	104
<i>Amostragem</i>	104
<i>Técnica parasitológica quantitativa para amostras ambientais</i>	105
5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	106
6. RESULTADOS	107
6.1. Caracterização climática do período de estudo	107
6.2. Caracterização da população estudada	109
6.3. Parasitismo dos animais	111
6.3.1. Prevalência	111
6.3.2. Nível de infecção parasitária	118
6.3.2.1. Ovos por grama de fezes (OPG)	118
6.3.2.2. Nível de infecção parasitária (NIP)	128
6.3.3. Biodiversidade de parasitas gastrointestinais	132
6.4. Estudo da contaminação ambiental por strongilídeos	140
6.4.1. Estudo da biodiversidade de larvas infetantes de strongilídeos na pastagem	140
6.4.2. Estudo da contaminação do estábulo	140
7. DISCUSSÃO	141
IV. CONCLUSÕES	150
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
VI. ANEXOS	196
ANEXO I - Inquérito epidemiológico	196
ANEXO II - Método de McMaster modificado	198
ANEXO III - Método de coprocultura modificado	199
ANEXO IV - Técnica de recolha de larvas infetantes	200
ANEXO V - Técnicas de recuperação e observação de larvas infetantes	201
ANEXO VI - Chave dicotómica para identificação das larvas infetantes	202
ANEXO VII - Técnica para amostragem e colheita de erva da pastagem	205
ANEXO VIII - Técnica para recuperar larvas infetantes da erva da pastagem	206

ANEXO IX - Técnica de contagem das larvas infetantes na pastagem	207
ANEXO X - Técnica de amostragem e colheita de palha e de feno	208
ANEXO XI - Técnica de McMaster para o estudo do nível de contaminação da palha e do feno	208

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica dos distritos com mais asininos em cada recenseamento desde 1930 até 2009	7
Figura 2 - Representação esquemática do ciclo biológico, com o desenvolvimento exógeno e endógeno, de <i>Strongylus vulgaris</i>	23
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo biológico dos Cyathostominae	27
Figura 4 - Localização do Planalto Mirandês	62
Figura 5 - Localização do solar da Raça Asinina de Miranda e respectiva área de dispersão	67
Figura 6 - Efeito da gravidade específica na flutuação dos ovos	74
Figura 7 - Câmara de contagem McMaster	78
Figura 8 - Diagrama da larva infetante	84
Figura 9 - Calendarização do trabalho experimental	91
Figura 10 - Animais da Raça Asinina de Miranda em lameiro de um centro de recuperação da AEPGA	94
Figura 11 - Colheita individual de fezes por palpação rectal	97
Figura 12 - Método de McMaster modificado	98
Figura 13 - Ovo do tipo estrongilídeo observado ao microscópio ótico	99
Figura 14 - Método de cultura fecal	100
Figura 15 - Larvas infetantes (L3) de <i>Cyathostomum sensu lato</i> morfotipo A e morfotipo D	101
Figura 16 - Extração das larvas infetantes da erva da pastagem	103
Figura 17 - Técnica de McMaster modificada para recuperar ovos de estrongilídeos da palha da cama e feno da manjedoura	105

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Platelminthes parasitas intestinais de asininos	13
Quadro 2 - Alguns nematodes parasitas gastrointestinais de asininos	14
Quadro 3 - Géneros e espécies da Família Strongylidae parasitas de equídeos	16
Quadro 4 - Anti-helmínticos utilizados no tratamento de helmintoses em asininos	59
Quadro 5 - Fontes de dados, métodos de recolha e de anotação	91
Quadro 6 - Tipos larvares, número e disposição de células intestinais do género <i>Cyathostomum sensu lato</i>	102
Quadro 7 - Resumo dos parâmetros e valores registados na estação meteorológica de Bragança entre dezembro 2009 e setembro de 2014	108
Quadro 8 - Caracterização da população de animais utilizados no estudo, desde dezembro de 2009 a setembro de 2014	109
Quadro 9 - Animais da Raça Asinina de Miranda utilizados no estudo epidemiológico durante um período de cinco anos, desde dezembro de 2009 a setembro de 2014	110
Quadro 10 - Prevalência de infecção parasitária e valores de OPG de mensais observados durante os cinco anos de estudo, de dezembro 2009 a setembro 2014	111
Quadro 11 - Correlação entre a prevalência de parasitismo mensal e as variáveis meteorológicas observadas durante o período de estudo	118
Quadro 12 - Valores de OPG observados durante o período de estudo	119
Quadro 13 - Resultados do teste ANOVA para níveis de OPG entre os meses, durante o período de estudo	121
Quadro 14 - Valores de OPG observados em função da idade dos animais estudados	124
Quadro 15 - Prevalências médias de géneros e espécies de parasitas gastrointestinais observados durante o estudo	133
Quadro 16 - Abundâncias proporcionais médias mensais e anuais de géneros e espécies de parasitas gastrointestinais (L3) observados nos asininos estudados	138
Quadro 17 - Larvas infectantes (L3) de estrongilídeos observadas na pastagem durante o período de estudo	140
Quadro 18 - Ovos de estrongilídeos observados na palha da cama do estábulo	140

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Diagrama pluviométrico com valores da precipitação média mensal (mm) e temperatura média mensal (°C), registados entre dezembro de 2009 e setembro de 2014	107
Gráfico 2 - Prevalência de parasitismo observada ao longo do período de estudo, com linha de tendência	112
Gráfico 3 - Prevalências de parasitismo observadas ao longo dos cinco anos de estudo (A, B, C, D e E), com as respectivas linhas de tendência	113
Gráfico 4 - Média global da taxa de prevalência de infecção por grupos etários	114
Gráfico 5 - Variação da taxa de prevalência de infecção por grupos etários durante o período de estudo	115
Gráfico 6 - Taxa de prevalência de infecção dos grupos etários nos dois últimos anos de estudo (A - 4º ano, B - 5º ano)	115
Gráfico 7 - Variação da taxa de prevalência de infecção por sexo durante o período de estudo	116
Gráfico 8 - Registo anual da taxa de prevalência com distribuição semelhante em ambos os sexos	116
Gráfico 9 - Variação da taxa de prevalência em relação à condição corporal durante o período de estudo	117
Gráfico 10 - Níveis mensais médios de OPG durante o período de estudo	118
Gráfico 11 - Valores de OPG médios anuais observados durante os cinco anos de estudo, de dezembro de 2009 a setembro de 2014	119
Gráfico 12 - Curvas de excreção de ovos observadas ao longo dos cinco anos de estudo (A, B, C, D e E), com as respectivas linhas de tendência	120
Gráfico 13 - Comparação entre os níveis médios de OPG da população de asininos e os valores de OPG registados num macho castrado durante o período de estudo	121
Gráfico 14 - Valores médios globais de OPG observados em cada mês	122
Gráfico 15 - Valores totais de OPG observados em cada mês durante período de estudo, com erro padrão da média	122
Gráfico 16 - Curva anual de excreção de ovos de <i>estrongilídeos</i> parasitas de asininos da Raça de Miranda, no Planalto Mirandês	123
Gráfico 17 - Valores anuais de OPG observados em função do grupo etário	125
Gráfico 18 - Flutuação do valor de OPG em função da idade da população estudada, ao longo dos cinco anos de estudo	126
Gráfico 19 - Variação dos valores anuais médios de OPG em relação ao sexo, ao longo dos cinco anos de estudo	127
Gráfico 20 - Variação dos valores anuais médios de OPG em relação à condição corporal, ao longo dos cinco anos de estudo	127
Gráfico 21 - Variação dos valores anuais médios de OPG em relação ao PTO, ao longo dos cinco anos de estudo	128
Gráfico 22 - Níveis de infecção parasitária (NIP) associados ao número médio de OPG observados durante o período de estudo	129
Gráfico 23 - Distribuição do NIP em relação aos grupos etários	129
Gráfico 24 - Nível de infecção parasitária em relação ao sexo	130
Gráfico 25 - Nível de infecção parasitária em relação ao sexo e meses estudados	130
Gráfico 26 - Distribuição do NIP em relação à condição corporal dos animais	131
Gráfico 27 - Distribuição do NIP em relação ao perímetro torácico dos animais	131

Gráfico 28 - Prevalências médias anuais de parasitas gastrointestinais, observados ao longo do estudo	134
Gráfico 29 - Prevalências médias globais dos parasitas durante o período de estudo (com barra do erro padrão da média)	134
Gráfico 30 - Prevalência de parasitas gastrointestinais (não Cyathostominae) observada no segundo ano de estudo	135
Gráfico 31 - Biodiversidade do género <i>Cyathostomum sensu lato</i> observada ao longo dos cinco anos de estudo	136
Gráfico 32 - Registo do valor médio anual global do número de larvas infetantes observadas ao longo dos cinco anos de estudo	137
Gráfico 33 - Flutuação anual do número de larvas observada no estudo	137
Gráfico 34 - Abundâncias proporcionais médias dos diferentes morfotipos de <i>Cyathostomum sensu lato</i> observados nos asininos estudados	138
Gráfico 35 - Abundâncias proporcionais médias do género <i>Cyathostomum sensu lato</i> (morfotipos B, C, D, E, F e G) e de parasitas gastrointestinais não ciatostomíneos observados	139

I. INTRODUÇÃO

A população de asininos sofreu uma regressão acentuada nas últimas quatro décadas. No entanto, atualmente tem-se observado um crescimento global da população mundial de asininos. Segundo dados da FAOSTAT (2015), em 2013 a população mundial de asininos aumentou para cerca de 43,5 milhões, encontrando-se 98,7% desta população, nos países em desenvolvimento de África (44,5%), Ásia (38,7%), América (15,5%) e apenas 1,2% na Europa.

No continente europeu o número de asininos declinou cerca de 78% entre 1970 e 2013. Em vários países europeus as raças asininas autóctones correm o risco de extinção devido ao reduzido número de exemplares existentes (Kugler *et al.*, 2008; Blakeway, 2014). Segundo Arsenos & Papadopoulos (2006) e Kugler *et al.* (2008), a maioria da população de asininos na Europa encontra-se em países mediterrânicos como Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia. Em Portugal ocorreu uma redução acentuada do número de asininos, tendo desaparecido cerca de 60% dos animais durante a década 1999 a 2009 (FAO, 2010), no entanto, observou-se um aumento de 5000 animais entre 2010 e 2013 (FAOSTAT, 2015). Barbosa (2003) refere que este decréscimo encontra-se relacionado com mecanização da agricultura, assim como com o abandono do mundo rural e da agricultura de subsistência, com o consequente desaparecimento de valores culturais e tradicionais no nosso país.

Atualmente os burros adquirem uma renovada utilidade e importância associada às profundas alterações sociais, culturais e económicas, ocorridas no mundo rural. O interesse pelo gado asinino em novas funções relacionadas com atividades de lazer e ecoturismo, assim como com atividades lúdico-terapêuticas, de manutenção da biodiversidade e de utilização como animal de companhia, tem vindo a aumentar no nosso país (Bacelar, 2006; AEPGA, 2015a).

Em resultado da importância dos efetivos asininos em Trás-os-Montes, foram realizadas algumas ações direcionadas para o estudo e preservação do gado asinino da região (Barbosa, 2003). Com o propósito de desenvolver um projeto multidisciplinar e sustentável, preservando o valioso património genético do Burro de Miranda mas também a sua herança histórica e cultural, foi criada, em Maio de 2001, a Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino (AEPGA). Desde então esta associação tem promovido novas funcionalidades do burro na sociedade atual, procurando estimular o interesse público para a problemática da sua extinção (AEPGA, 2015c).

Apesar da sua resistência e robustez, os asininos são animais vulneráveis às parasitoses (Hosseini *et al.*, 2009; Chitra *et al.*, 2011), sendo o parasitismo por helmintes a principal

causa de morbidade e mortalidade destes animais (Swann, 2006; Chitra *et al.*, 2011; Waqas *et al.*, 2015). Yilma *et al.* (1991), Bucknell *et al.* (1996), Lyons *et al.* (2000) e Ayele *et al.* (2006), referem a ocorrência de infecções mistas, com mais de 20 espécies diferentes de estrongilídeos num mesmo hospedeiro, considerando que as estrongilidoses, causadas pelos estrongilíneos e ciatostomíneos, são as que mais debilitam o estado geral dos asininos.

Contudo e surpreendentemente, os estudos sobre doenças parasitárias em asininos têm sido negligenciados e, conseqüentemente, não existem muitas publicações detalhadas sobre a biodiversidade parasitária assim como a sua prevalência, incidência e efeitos na saúde dos asininos, pelo que o conhecimento atual continua a ser muito reduzido (Waqas *et al.*, 2014; 2015).

Embora ainda seja reduzida a informação sobre a biodiversidade, prevalência de infecção e modo de transmissão de parasitas gastrointestinais em asininos, diversos autores consideram importante conhecer a biodiversidade parasitária dos asininos, assim como a sua distribuição na população hospedeira, para que se possa adotar medidas terapêuticas adequadas (Medica *et al.*, 2001; Morriss *et al.*, 2004).

Segundo Javed *et al.* (2014), a negligência das medidas de manejo adequadas e a ausência de programas de controlo parasitário eficazes, aumentam a importância das parasitoses em asininos. Waqas *et al.* (2015) referem que o parasitismo interno associado ao trabalho forçado, stresse e má nutrição pode prejudicar gravemente a saúde, causando a morte dos asininos.

O tratamento das infecções parasitárias é particularmente importante em asininos por ter um efeito benéfico na sua capacidade de trabalho e atividade reprodutora (Curran *et al.*, 2005; Krecek & Waller, 2006; Swann, 2006; Krecek, 2014a).

Os estrongilídeos parasitas de asininos são frequentes em regiões do mundo com características geográficas e climáticas muito diversas. Surpreendentemente, os autores referem prevalências de infecção consistentemente elevadas e biodiversidade semelhante, observando-se as mesmas espécies dominantes independentemente da ampla diferença de climas, continentes e regiões do globo (Asefa *et al.*, 2011; Nielsen, 2012; Waqas *et al.*, 2015).

Em Portugal os equídeos apresentam um parasitismo caracterizado por cargas parasitárias e biodiversidade elevadas e potencialmente muito patogénico (Madeira de Carvalho, 2006). O autor refere que embora os anti-helmínticos tenham sofrido um grande desenvolvimento nos últimos 20 anos, não eliminaram os parasitas, particularmente os gastrointestinais. O conhecimento da população parasitária envolvida, assim como a conjugação da administração de anti-helmínticos com medidas de manejo, higiene e sanidade básicas, constituem a chave para um controlo integrado das parasitoses em equídeos.

Considerando o estatuto parasitológico dos animais da Raça Asinina de Miranda, observado no solar da raça até 2008, em que a população foi sujeita ao tradicional controlo anti-helmíntico estratégico, foi delineada uma nova abordagem de controlo parasitário seletivo para esta população.

Assim, com este trabalho pretende-se observar o estatuto parasitológico dos animais da raça Asinina de Miranda sujeitos ao controlo parasitológico seletivo. Com ele pretende-se contribuir para um melhor conhecimento do parasitismo gastrointestinal envolvido, em particular por *strongilídeos*, e das consequências da adoção de diferentes medidas terapêuticas antiparasitárias, concorrendo para o estudo e proteção do gado asinino, em particular da Raça de Miranda, a única raça asinina autóctone registada e reconhecida em Portugal.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA DOS ASININOS

Os equídeos terão surgido há cerca de 60 milhões de anos, durante o Eoceno inferior, no continente americano, onde hoje é o México. Durante o Plistoceno, o primeiro representante dos equídeos, *Hyracotherium*, ter-se-á dispersado e adaptado a vários ambientes originando várias formas evolutivas até ao género *Equus* (Groves & Ryder, 2000; MacFadden, 2013).

Ao longo de 55 milhões de anos surgiram adaptações evolutivas, condicionadas pelas alterações climáticas e geográficas, melhor adequadas à vida em espaços abertos, como estepes e pradarias, desenvolvendo formas evolutivas cada vez mais semelhantes aos equídeos atuais. Os equídeos foram aumentando de estatura, diminuindo o número de dedos e fortalecendo as mandíbulas e molares, de modo a se adaptarem melhor às grandes planícies de erva seca (Groves & Ryder, 2000; Famoso & Davis, 2014).

O género *Equus* terá desaparecido do continente americano há cerca de um milhão de anos, provavelmente devido à última era glacial. No entanto, sobreviveram os seus descendentes europeus, asiáticos e africanos (Groves, 1995; Groves & Ryder, 2000).

Os atuais equídeos são mamíferos herbívoros ungulados da ordem *Perissodactyla* e subordem *Hippomorpha*. Estes apresentam casco com um só dedo funcional e incluem a família *Equidae* com o género *Equus* que abrange os cavalos (*Equus caballus* e *Equus przewalskii*), os burros (*Equus asinus* e *Equus hemionus*) e as zebras (*Equus grevyi*, *Equus quagga* e *Equus zebra*) (Vilà *et al.*, 2006; Hugler *et al.*, 2008; MacFadden, 2013; Vilstrup *et al.*, 2013).

1.1. Origem dos asininos domésticos

Sabe-se que os asininos emergiram do tronco comum dos equídeos, mas desconhece-se o momento exato em que se terão separado das outras espécies do género *Equus*. Alguns autores consideram que a separação terá ocorrido durante a era terciária, no Plioceno Superior, há cerca de dois milhões de anos, outros defendem que se terá iniciado na era quaternária, no Plistoceno, há aproximadamente um milhão de anos (Davézé & Raveneau, 1994; Eisenmann, 1995 Kimura *et al.*, 2011).

A domesticação do gado asinino ter-se-á iniciado no final da Idade do Bronze, há cerca de 6000 a 6500 anos, no nordeste de África, a partir do burro selvagem africano (*Equus*

africanus) (Beja-Pereira *et al.*, 2004; FAO, 2007).

Beja-Pereira *et al.* (2004) e Kimura *et al.* (2011) demonstram, por estudos de DNA mitocondrial, que o asinino doméstico atual (*Equus asinus*) tem duas linhagens genéticas derivadas de duas subespécies africanas, o burro selvagem da Núbia (*Equus africanus africanus*) e o burro selvagem da Somália (*Equus africanus somaliensis*).

Segundo uma das teorias aceites sobre a filogenia dos asininos domésticos, estes terão divergido em dois grandes grupos, troncos ou tipos primários. As raças do tronco ou tipo africano, *Equus asinus africanus*, originárias da bacia do rio Nilo no Egipto, difundiram-se por todo o mundo pela sua aptidão ao trabalho. As raças do tipo europeu, *Equus asinus europeus*, originárias da Europa Mediterrânica, permaneceram confinadas nesta área geográfica apresentando uma forte aptidão mulateira (Denel, 2001; Aranguren-Mendez *et al.*, 2001, 2002).

A domesticação dos asininos poderá ter sido uma resposta à desertificação do Sahara, iniciada há cerca de 7000 a 5000 anos. As populações desta região foram obrigadas a deslocamentos frequentes, e cada vez maiores, em busca de fontes de água e de pasto para os seus animais (Beja-Pereira *et al.*, 2004; FAO, 2007). Os asininos terão sido os primeiros animais domesticados utilizados no transporte (Orhan *et al.*, 2012), o que terá permitido migrações de longo curso, em direção ao Crescente Fértil e Eurásia (Hugler *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2011).

1.2. Distribuição geográfica da população de asininos

1.2.1. No mundo

Após a sua domesticação, ocorrida entre 6000 a 6500 anos, o burro doméstico migrou do nordeste de África, em direção ao Crescente Fértil e Eurásia. Há 4000 anos, já era utilizado como animal doméstico na Europa, como documentam as pinturas rupestres encontradas nos Alpes e Península Ibérica. Há cerca de 1000 anos foi introduzido na Índia, arquipélago malaio, China e Mongólia. E durante o século XVI foi introduzido na América do Sul pelos portugueses e espanhóis (Kimura *et al.*, 2011).

Ao longo da história a importância dos asininos, e consequentemente a sua densidade e distribuição geográfica, tem oscilado por razões culturais, sociais e económicas dos povos que os utilizaram como animais domésticos, frequentemente na agricultura e transporte (Hugler *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2011; Yilmaz & Wilson, 2013).

Nas últimas décadas tem-se registado um crescimento global da população mundial de asininos. Em 1970 a população mundial foi estimada em 39 milhões de asininos, sendo que 94,0% da população se encontrava em países em vias de desenvolvimento da Ásia (45,4%), África (28,9%) e América (19,7%) e apenas 6,0% se encontrava em países industrializados da Europa. Em 2013 a população mundial aumentou para cerca de 43,5 milhões de asininos, encontrando-se 98,7% desta população, nos países em desenvolvimento de África (44,5%), Ásia (38,7%), América (15,5%) e apenas 1,2% na Europa (FAOSTAT, 2015).

Na Europa, o número de asininos declinou cerca de 78,0% entre 1970 e 2013 com a redução de 2,3 milhões para apenas 535774 animais. Durante este período, observou-se um declínio de 74,7% da população de asininos nos países que atualmente compõem a União Europeia, onde o número de asininos registados passou de 1689678 em 1970 para apenas 427782 em 2013 (FAOSTAT, 2015).

Como consequência da redução do número de asininos na Europa, várias raças asininas autóctones, correm o risco de extinção em vários países europeus (Kugler *et al.*, 2008; Blakeway, 2014). De entre as razões para o decréscimo a nível europeu salienta-se a mecanização da agricultura, o abandono do mundo rural e da agricultura de subsistência com o consequente desaparecimento de valores culturais e tradicionais (Pearson *et al.*, 2003; Yilmaz & Wilson, 2013; Blakeway, 2014).

Segundo Arsenos & Papadopoulos (2006) e Kugler *et al.* (2008), a maioria da população de asininos na Europa encontra-se em países mediterrânicos como Portugal, Espanha, França e Grécia.

1.2.2. Em Portugal

Durante os últimos anos, o número de asininos tem vindo a diminuir de tal forma que, frequentemente, se ouve falar no seu desaparecimento ou extinção no nosso país. De acordo com os recenseamentos dos últimos 140 anos, ocorreu um aumento significativo do número de asininos em Portugal continental até ao ano de 1934, quando se atingiu um valor de 268 mil animais (Barbosa, 2003). Desde então tem-se observado uma diminuição continuada do número de asininos, registando-se um decréscimo de 36,7% do efetivo entre 1972 e 2010, com redução de 181675 para 115000 animais (FAOSTAT, 2015).

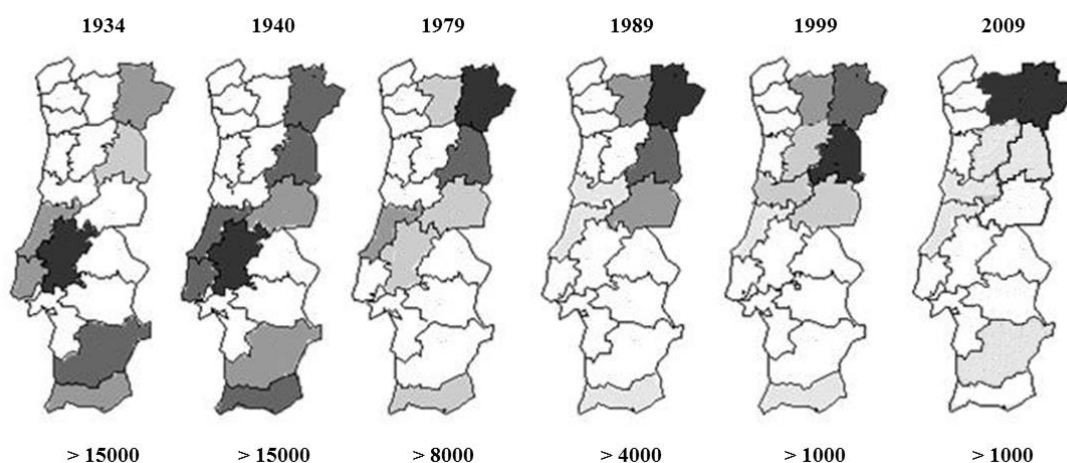
Segundo o último recenseamento agrícola nacional, entre 1999 e 2009, em Portugal ocorreu uma quebra acentuada do número de asininos e muares, tendo desaparecido cerca de 60,0% dos animais nesta década (FAO, 2010). No entanto, entre 2010 e 2013 observou-se um

crescimento de 0,004% do número de asininos em Portugal, correspondendo a um aumento de 5000 animais entre 2010 e 2013 (FAOSTAT, 2015).

Uma das razões mais apontadas para o declínio do efetivo asinino é a mecanização da agricultura, que se verificou a partir da década de 1960, e que reduziu a importância dos animais de trabalho (Barbosa, 2003).

Ao longo do século XX, o efetivo asinino não teve a mesma importância relativa em todos os distritos do país (Figura 1). Verifica-se, em comparação com os recenseamentos anteriores, que o gado asinino foi perdendo importância relativa nas diferentes regiões do país, aumentando na região interior de Trás-os-Montes (Barbosa, 2003; FAO, 2010).

Figura 1 - Distribuição geográfica dos distritos com mais asininos em cada recenseamento desde 1930 até 2009 (Adaptado de Barbosa, 2003 e FAO, 2010).



Na região de Trás-os-Montes

De acordo com a evolução demográfica do gado asinino em Portugal, também em Trás-os-Montes se verificou um decréscimo do número de asininos a partir de 1960. Durante a década de 1990, entre 1989 e 1999, observou-se uma acentuada redução do efetivo asinino em Trás-os-Montes, diminuindo 48,0% no distrito de Bragança e 37,0% em Vila Real (Barbosa, 2003). De acordo com o último recenseamento agrícola, em 2009 a importância de asininos e muares em Trás-os-Montes é notória, representando 73,0% do efetivo equídeo nesta região. Os distritos de Bragança e Vila Real apresentam o maior efetivo asinino da região, observando-se, no concelho de Chaves, que uma em cada cinco explorações tem efetivo asinino (FAO, 2010).

Na região de Trás-os-Montes o decréscimo do número de asininos está associado ao abandono

do mundo rural e da agricultura de subsistência assim como ao envelhecimento da população humana. Segundo os autores, este decréscimo também está associado ao envelhecimento do efetivo asinino, assim como à relativa indisponibilidade de machos inteiros, pelo seu número reduzido, e pelas dificuldades no transporte dos animais até aos locais/postos de cobrição (Barbosa, 2003; Bacelar, 2006).

No entanto, é possível que o aumento do número de asininos em Trás-os-Montes, observado nestes últimos anos, esteja associado às novas funcionalidades destes animais na região, como o ecoturismo, atividades lúdico-terapêuticas e de lazer, assim como a sua utilização como animal de companhia (AEPGA, 2015a).

1.3. Importância do gado asinino

1.3.1. No mundo

Desde a sua domesticação, os asininos sempre assumiram um papel importante na economia das famílias pobres, estando desde sempre associados à força de trabalho na agricultura (Kuger *et al.*, 2008; Bogale *et al.*, 2012; Orhan *et al.*, 2012), em particular em zonas áridas com topografia irregular (Hossen *et al.*, 2009; Burn *et al.*, 2010).

Em todo o mundo, os asininos também são utilizados no comércio de carne, leite e pele (Dobranic *et al.*, 2008; Polidori & Vincenzetti, 2012, 2013), assim como reprodutores para a produção mulateira, para guarda e acompanhamento de rebanhos, em atividades de recreio e lazer, e como animais de estimação (Metz, 1995; French, 1999; FAO/WEP, 2015). Kuzmina & Kuzmin (2008) e Yilmaz & Wilson (2013), referem ainda a sua utilização no exército, em circos e escolas de equitação, assim como o facto de serem mantidos em reservas naturais e jardins zoológicos.

Atualmente os asininos são os animais de tração mais utilizados em todo o mundo, sendo o pilar de desenvolvimento da agricultura, transportes, comércio e economia dos países em vias de desenvolvimento (Hassan *et al.*, 2013; FAO, 2014; Gobesso, 2014; Upjohn *et al.*, 2014; FAO/WFP, 2015; Zewdie *et al.*, 2015).

Estima-se que cerca de 50,0% da energia necessária para a produção agrícola, em todo o mundo, é originária de animais sendo o gado asinino a principal fonte (Morris *et al.*, 2004; Swann, 2006). Os asininos têm um importante papel socioeconómico nos países em desenvolvimento (Tesfaye & Curran, 2005; Van Dijk, 2011; FAO, 2014; Valette, 2014; Zewdie *et al.*, 2015), sendo a saúde e bem-estar destes animais, frequentemente, a única

riqueza familiar da população dos países pobres de África e Ásia (Pritchard *et al.*, 2005; Swann, 2006; Kuger *et al.*, 2008; Valette, 2014; Fitsum & Ahmed, 2015). No entanto, os asininos são frequentemente negligenciados pela sociedade civil em geral, pela existência de mitos e tabus culturais, assim como pela classe política que os exclui de estratégias e programas de desenvolvimento relevantes. A falta de reconhecimento da importância socioeconómica dos asininos dificulta a sua inclusão em sistemas de saúde animal adequados, como campanhas de vacinação e de desparasitação (Hassan *et al.*, 2013; FAO, 2014; Rahman & Reed, 2014; Valette, 2014; Upjohn *et al.*, 2014; Fitsum & Ahmed, 2015). Com cuidados veterinários insuficientes, os asininos encontram-se expostos a numerosos agentes de doenças que afetam negativamente a esperança de vida e diminuem a sua capacidade de trabalho (FAO, 2014; Rahman & Reed, 2014; Regan *et al.*, 2014; Stringer, 2014; Valette, 2014; Fitsum & Ahmed, 2015; Zewdie *et al.*, 2015).

Considerando o estado atual dos asininos em todo o mundo, e particularmente nos países economicamente menos desenvolvidos, várias organizações não-governamentais internacionais e intergovernamentais têm colaborado de forma a envolver a sociedade civil e política locais, no sentido de melhorar a saúde e bem-estar destes animais, capacitando o desenvolvimento local (Jones, 2008; Van Dijk *et al.*, 2011; Hassan *et al.*, 2013; Blakeway, 2014; FAO, 2014; Magistrini, 2014; Rahman & Reed, 2014; Upjohn *et al.*, 2014; FAO/WEP, 2015; Fitsum & Ahmed, 2015; Upjohn *et al.*, 2015).

Nos países industrializados, assistiu-se a uma perda gradual da funcionalidade dos asininos (FAO, 2007, 2015).

Por toda a Europa, mas em particular no Cáucaso, os asininos continuam a desempenhar um papel importante na agricultura assim como no transporte de bens e pessoas (Kuzmina *et al.*, 2006; WHW, 2015c). No entanto, pela diminuição da utilização do gado asinino, na Europa Ocidental assiste-se a um esforço de preservação das raças autóctones encontrando-se novas funcionalidades relacionadas com atividades ecológicas de manutenção da biodiversidade, assim com atividades de lazer, turismo, lúdicas e terapêuticas, valorizando a economia local e o bem-estar animal (Rose *et al.*, 2011; WHW, 2015a,c). Na Europa Comunitária, a importância do gado asinino é evidenciada pela existência de legislação e regulamentação protetoras, resultante da colaboração ativa entre instituições académicas e organizações governamentais e não-governamentais de vários países (WHW, 2015b).

1.3.2. Em Portugal

Em Portugal o gado asinino tem associado a si um vasto património de importância social, cultural, económica e ecológica (Barbosa, 2003). A paisagem rural do Douro está associada aos asininos, sendo estes muito utilizados no aproveitamento agrícola de locais estreitos onde não era possível a introdução de bovinos ou da mecanização (Samões, 2000).

No passado, em Portugal, algumas profissões estavam diretamente relacionadas com os asininos, como por exemplo o carpinteiro que fabricava o jugo, o arado, o carro e a grade; o moleiro que trabalhava na moagem; o almocreve que conduzia bestas de carga; o carvoeiro que fazia ou vendia carvão. Atualmente, no nosso País, ainda existem profissões ligadas ao gado asinino, tais como a de tecelão de alforjes e ferrador de cascos (Samões, 2000).

O artesanato está desde há muito tempo ligado ao gado asinino. Os cestos esterqueiros e as cangalhas, as albardas, os alforjes e as mantas de retalhos são peças únicas de artesanato nacional (Samões, 2000).

Em Portugal, o leite de burra foi muito utilizado pelas populações rurais como alimento e por ser considerado um bom cicatrizante também era utilizado em pomada nas feridas e doenças de pele (Samões, 2000). Nos nossos dias, é um produto explorado pela indústria alimentar e cosmética (Denel, 2001; Bacelar, 2006).

Em Trás-os-Montes

O gado asinino desempenhou, e continua a desempenhar, um papel fundamental na frágil economia das populações rurais das regiões transmontanas desfavorecidas (AEPGA, 2015a).

Segundo Barbosa (2003), atualmente, a importância social e económica dos asininos em Trás-os-Montes apresenta uma relevância que vai para além dos trabalhos/funções tradicionais, estando intimamente associada ao envelhecimento da população rural.

O gado asinino sempre teve uma presença importante nas atividades do meio rural na região de Trás-os-Montes (Meirinho, 2000; Barbosa, 2003). Com especial aptidão para a lavoura tradicional de minifúndio, são utilizados nas principais atividades agropecuárias realizadas ao longo do ano (Bacelar, 2006).

Atualmente, os asininos são essencialmente utilizados como animais de tração, sela e carga a dorso, dando resposta eficaz às necessidades de transporte, das pessoas e do alimento para o gado (AEPGA, 2015a).

Sobrevivendo à mecanização agrícola, ao êxodo e envelhecimento da população rural graças à sua rusticidade, polivalência e docilidade, o gado asinino não só conseguiu assegurar as

tarefas que anteriormente desempenhava, como adquiriu novas funções e demonstra potencialidades para funções futuras. Com as profundas alterações sociais, culturais e económicas, ocorridas no mundo rural, os burros adquirem, hoje, renovada utilidade e importância. O interesse pelo gado asinino em novas funções relacionadas com atividades de lazer e ecoturismo, assim como com atividades lúdico-terapêuticas, de manutenção da biodiversidade e de utilização como animal de companhia, tem vindo a aumentar no nosso país (Bacelar, 2006; AEPGA, 2015a).

A utilização do burro como recurso ecoturístico é uma atividade recente no nosso país, onde existe procura de ambientes naturais e rurais preservados com maior contacto com eventos culturais e costumes das populações locais. A presença do gado asinino nas paisagens rurais, surge como um complemento da imagem da região de Trás-os-Montes contribuindo para a recuperação do seu efetivo e para potenciar um modelo socioeconómico que respeite e preserve os valores culturais e naturais da região do nordeste trasmontano. As atividades lúdico-terapêuticas assistidas por animais de temperamento dócil, paciente, atento, curioso, inteligente e fisicamente robusto e estável são relevantes pela sua importância terapêutica, ética e social (AEPGA, 2015a).

A aptidão que os asininos têm para o pastoreio, fundamental para a preservação da biodiversidade florística dos lameiros, que se degradam caso não sejam pastoreados, previne o avanço de matos descaracterizados da paisagem rural e facilitadores da propagação de fogos (AEPGA, 2015a,c).

Em resultado da importância do efetivo asinino em Trás-os-Montes e do decréscimo do seu número, verificado nas últimas décadas, foram realizadas algumas ações direcionadas para o estudo e preservação do gado asinino da região (Barbosa, 2003).

Em 1999, o Parque Natural do Douro Internacional promoveu o estudo da caracterização fenotípica dos asininos presentes na região, identificando-se um tipo local de asinino conhecido regionalmente como Burro de Miranda. Os dados obtidos permitiram individualizar um reduzido efetivo de animais, de características biométricas idênticas, e justificaram a criação de uma raça autóctone (Samões, 2000). A Raça Asinina de Miranda é a única raça autóctone portuguesa de asininos e segundo a International Union for the Conservation of Nature (IUCN) encontra-se em perigo de extinção, por ser uma raça doméstica com menos de 1000 indivíduos (IUCN, 2002).

Com o propósito de desenvolver um projeto multidisciplinar e sustentável, preservando o valioso património genético do Burro de Miranda mas também a sua herança histórica e cultural, foi criada, em Maio de 2001, a Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino (AEPGA). Desde então esta associação tem promovido novas funcionalidades do

burro na sociedade atual, procurando estimular o interesse público para a problemática da sua extinção (AEPGA, 2015c).

Em Junho de 2002 foi homologado o Regulamento de Registo Zootécnico da Raça Asinina de Miranda (AEPGA, 2015c).

A homologação desta raça autóctone e a existência da AEPGA, permitem a realização de diversas atividades tais como a inscrição de animais no Registo Zootécnico e a captação de ajudas financeiras para as atividades de preservação e proteção desta raça autóctone (Barbosa, 2003).

De acordo com AEPGA (2015a), em termos quantitativos, com base em dados de 2012, estimou-se a existência de um máximo de 850 fêmeas reprodutoras e de cerca de 40 machos inteiros disponíveis, jovens e adultos, distribuídos por todo o país. Contudo o número de animais com capacidade reprodutiva é inferior pelo facto de muitas fêmeas apresentarem problemas reprodutivos, principalmente pela idade avançada, e pela indisponibilidade de machos inteiros adultos.

2. PARASITISMO GASTROINTESTINAL POR HELMINTES EM ASININOS

Apesar da sua resistência e robustez, os asininos são animais vulneráveis e expostos a muitas parasitoses (Hosseini *et al.*, 2009; Chitra *et al.*, 2011), sendo o parasitismo por helmintes a principal causa de morbilidade e mortalidade destes animais (Swann, 2006; Chitra *et al.*, 2011; Waqas *et al.*, 2015). Contudo e surpreendentemente, os estudos de investigação sobre doenças parasitárias em asininos têm sido negligenciados e, conseqüentemente, não existem muitas publicações detalhadas sobre a biodiversidade parasitária assim como a sua prevalência, incidência e efeitos na saúde dos asininos, pelo que o conhecimento atual continua a ser muito reduzido (Waqas *et al.*, 2014; 2015).

Segundo Krecek (2014a), o primeiro estudo detalhado sobre parasitas de equídeos foi publicado em 1923 por Gertrud Theiler, onde incluiu 48 burros, cavalos e zebras.

Embora ainda seja reduzida a informação sobre a biodiversidade, prevalência de infeção e modo de transmissão de parasitas gastrointestinais em asininos, os autores consideram importante conhecer a biodiversidade parasitária dos asininos, assim como a sua distribuição na população hospedeira, para que se possa adotar medidas terapêuticas adequadas (Medica *et al.*, 2001; Morriss *et al.*, 2004).

Vários autores, em diferentes regiões do mundo, observam prevalências elevadas de parasitismo gastrointestinal por helmintes em asininos. Sendo referidos valores de 93,8 a

100% de prevalência na Etiópia (Asefa *et al.*, 2011; Ibrahim *et al.*, 2011; Mezgebu *et al.*, 2013; Tsegaye & Chala, 2015), na Turquia (Uslu & Guçlu, 2007) e no Iraque (Wannas *et al.*, 2012), de 79,1 a 82,9% na Índia (Shrikhande *et al.*, 2009; Chitra *et al.*, 2011), de 77% no Brasil (Filho *et al.*, 2013), de 56,7 a 70,1% a no Sudão (Seri *et al.*, 2004; Angara *et al.*, 2011) e de 55,7% no Paquistão (Waqas *et al.*, 2014).

Os asininos são hospedeiros de mais de 100 espécies diferentes de helmintes parasitas gastrointestinais (Trawford & Mulugeta, 2008; Krecek, 2013, 2014a), incluindo platelmintes (Quadro 1) e nematelmintes das superfamílias Strongyloidea Baird, 1853, Rhabditoidea Örley, 1880, Ascaridoidea Baird, 1853, Trichostrongyloidea Durette-Desset, 1985, Oxyuroidea (Quadro 2) e Spiruroidea Railliet & Henry, 1915 como os géneros *Habronema* Diesing 1861 e *Draschia* Chitwood & Wehr 1934 (Bowman *et al.*, 2014; WORMS, 2014).

No entanto o grupo de parasitas internos com maior relevância na saúde e bem-estar dos asininos é a classe Nematoda Rudolphi, 1808 que inclui cerca de 70 espécies patogénicas (Krecek, 2013, 2014a), das quais 64 são estrongilídeos (Lichtenfels *et al.*, 2008).

Quadro 1 - Platelminthes parasitas intestinais de asininos (Trawford & Mulugeta, 2008; Krecek, 2013, 2014a; WORMS, 2014; EUNIS, 2015).

Filo	Platyhelminthes Gegenbaur, 1859			
Classe	Subclasse	Ordem	Família	Género
Trematoda Rudolphi, 1808	Digenea Carus, 1863		Paramphistomatidae	<i>Gastrodiscus</i> Cobbold, 1876
			Fischneider, 1901	<i>Pseudodiscus</i> Cobbold, 1875
Cestoda van Beneden, 1849		Cyclophyllidea van Beneden, 1900	Anoplocephalidae	<i>Anoplocephala</i> Blanchard, 1848
			Cholodkovsky, 1902	<i>Paranoplocephala</i> Lühe, 1910

Quadro 2 - Alguns nematodes parasitas gastrointestinais de asininos (Trawford & Mulugeta, 2008; Lichtenfels *et al.*, 2008; Krecek, 2013, 2014a; WORMS, 2014; EUNIS, 2015).

Filo	Nemathelminthes Schneider, 1873		
Classe	Nematoda Rudolphi, 1808		
Ordem	Família	Subfamília	Género
Strongylida Molin, 1861	Strongylidae Baird, 1853	Strongylinae Railliet, 1885	<i>Bidentostomum</i> Tshoiho, 1957 <i>Craterostomum</i> Boulenger, 1920 <i>Oesophagodontus</i> Railliet & Henry, 1902 <i>Strongylus</i> Müller, 1780 <i>Triodontophorus</i> Loss, 1902
		Cyathostominae Nicoll, 1927	<i>Caballonema</i> Abuladze, 1937 <i>Coronocylus</i> Hartwich, 1986 <i>Cyathostomum</i> Molin, 1861 <i>Cylicocylus</i> Ihle, 1922 <i>Cylicodontophorus</i> Ihle, 1922 <i>Cylicostephanus</i> Ihle, 1922 <i>Cylindropharynx</i> Leiper, 1911 <i>Gyalcephalus</i> Looss, 1902 <i>Hsiungia</i> K'ung & Yang, 1964 <i>Parapoteriostomum</i> Hartwich, 1986 <i>Petrovinema</i> Ershov, 1943 <i>Poteriostomum</i> Quiel, 1919 <i>Skrjabinodontus</i> Tshoiho, in Popova, 1958 <i>Tridentoinfundibulum</i> Tshoiho, in Popova, 1958
Rhabditida Chitwood, 1933	Trichostrongylidae Leiper, 1912	Trichostrongylinae Leiper, 1908	<i>Trichostrongylus</i> Looss, 1905
	Strongyloidea Chitwood & McIntosh, 1934		<i>Strongyloides</i> Ihle, 1917
Ascaridida Baird, 1853	Ascarididae Baird, 1853	Ascaridinae Baird, 1853	<i>Parascaris</i> Yorke & Maplestone, 1926
Oxyurida Cobbold, 1864	Oxyuridae Cobbold, 1864	Oxyurinae Probstmayriinae	<i>Oxyuris</i> Rudolphi, 1803 <i>Probstmayria</i> Ransom, 1917

3. SISTEMÁTICA E TAXONOMIA DOS ESTRONGILÍDEOS

Os estrongilídeos constituem um grupo numeroso e diversificado de parasitas (Lichtenfels *et al.*, 2008). De acordo com Cernea *et al.* (2008) e Lichtenfels *et al.* (2008), os estrongilídeos agrupam-se no Filo Nemathelminthes Schneider, 1873, Classe Nematoda Rudolphi, 1808, Subclasse Secernentea Dougherty, 1958, Ordem Strongylida Molin, 1861, Superfamília Strongyloidea Weinland, 1958, Família Strongylidae Baird, 1853, Subfamília Strongylinae

Railliet, 1885 e Subfamília Cyathostominae Nicoll, 1927.

De acordo com Madeira de Carvalho (2001) a classificação frequentemente utilizada em trabalhos de sistemática e epidemiologia de estrongilídeos de equídeos baseia-se em características morfológicas, em particular da extremidade cefálica ou anterior.

Segundo Cernea *et al.* (2008), os nematodes da Família Strongylidae Baird, 1853, que apresentem cápsula bucal sub-globular ou em forma de funil pertencem à Subfamília Strongylinae Railliet, 1885 e são designados por estrongilíneos ou grandes estrongilídeos. Os nematodes com cápsula bucal cilíndrica ou em forma de anel pertencem à Subfamília Cyathostominae Nicoll, 1927 e são conhecidos como ciatostomíneos ou pequenos estrongilídeos.

A sistemática e a taxonomia dos estrongilídeos dos equídeos têm sido, contudo, temas controversos (Cernea *et al.*, 2008). Madeira de Carvalho (2001) Lichtenfels *et al.* (2002) e Chapman *et al.* (2003) observam que a subfamília Strongylinae tem mantido as designações originais e um reduzido número de espécies, enquanto a subfamília Cyathostominae é frequentemente referenciada com várias designações e posições taxonómicas.

Na tentativa de explicar a atual instabilidade da posição taxonómica das numerosas espécies da subfamília Cyathostominae, Troncy (1980) *cit. in* Madeira de Carvalho (2001) e Traversa *et al.* (2007a) referem a possibilidade de, os ciatostomíneos, estarem em “explosão evolutiva” com formação de novas espécies por mecanismos de hibridação interespecífica.

Os sistemas de classificação baseados nas características morfológicas, associados às técnicas de biologia molecular assim como aos estudos filogenéticos dos estrongilídeos dos equídeos, têm permitido progressos significativos na compreensão da sistemática deste complexo grupo de nematodes (Gasser, 2001; Hodgkinson, 2006; Traversa *et al.*, 2007b).

Hung *et al.* (2001) referem que o sistema de classificação de Lichtenfels *et al.* (1998) é o mais completo e atualizado. Madeira de Carvalho (2001) considera que este sistema de classificação deve ser adotado na identificação dos estrongilídeos dos equídeos. Segundo uma revisão cuidadosa dos vários sistemas de classificação, Madeira de Carvalho (2001) e a mais recente atualização da chave de classificação de estrongilídeos de Cernea *et al.* (2008) e Lichtenfels *et al.* (2008), atualmente são reconhecidos cinco géneros de estrongilíneos e 14 géneros de ciatostomíneos e 64 espécies (Quadro 3).

Quadro 3 - Gêneros e espécies da família Strongylidae parasitas de equídeos (Adaptado de Madeira de Carvalho, 2001; Cernea *et al.*, 2008; Lichtenfels *et al.*, 2008).

Subfamília Strongylinae	
Strongylus Müller, 1780 <i>Strongylus asini</i> <i>Strongylus edentatus</i> <i>Strongylus equinus</i> <i>Strongylus vulgaris</i>	Triodontophorus Loss, 1902 <i>Triodontophorus brevicaudata</i> <i>Triodontophorus burchelli</i> <i>Triodontophorus hartmannae</i> <i>Triodontophorus minor</i> <i>Triodontophorus nipponicus</i> <i>Triodontophorus tennicollis</i> <i>Triodontophorus serratus</i>
Bidentostomum Tshoijs, 1957 <i>Bidentostomum ivashkini</i>	
Oesophagodontus Railliet & Henry, 1902 <i>Oesophagodontus robustus</i>	Craterostomum Boulenger, 1920 <i>Craterostomum acuticaudatum</i> <i>Craterostomum tenuicauda</i>
Subfamília Cyathostominae	
Coronocylus Hartwich, 1986 <i>Coronocylus agittatus</i> <i>Coronocylus coronatus</i> <i>Coronocylus labiatus</i> <i>Coronocylus labratus</i> <i>Coronocylus ulambajari</i>	Cyathostomum Molin, 1861 <i>Cyathostomum alveatum</i> <i>Cyathostomum catinatum</i> <i>Cyathostomum montgomeryi</i> <i>Cyathostomum pateratum</i> <i>Cyathostomum tetracanthum</i>
Cylicocylus Ihle, 1922 <i>Cylicocylus adersi</i> <i>Cylicocylus ashworthi</i> <i>Cylicocylus asini</i> <i>Cylicocylus auriculatus</i> <i>Cylicocylus brevicapsulatus</i> <i>Cylicocylus elongatus</i> <i>Cylicocylus gyalcephalodes</i> <i>Cylicocylus insigne</i> <i>Cylicocylus leptostomum</i> <i>Cylicocylus nassatus</i> <i>Cylicocylus radiatus</i> <i>Cylicocylus triramosus</i> <i>Cylicocylus ultrajectinus</i>	Cylicostephanus Ihle, 1922 <i>Cylicostephanus asymmetricus</i> <i>Cylicostephanus bidentatus</i> <i>Cylicostephanus calicatus</i> <i>Cylicostephanus goldi</i> <i>Cylicostephanus hybridus</i> <i>Cylicostephanus longibursatus</i> <i>Cylicostephanus minutus</i>
Cylindropharynx Leiper, 1911 <i>Cylindropharynx brevicauda</i> <i>Cylindropharynx intermedia</i> <i>Cylindropharynx longicauda</i>	Parapoteriostomum Hartwich, 1986 <i>Parapoteriostomum euproctus</i> <i>Parapoteriostomum mettami</i> <i>Parapoteriostomum mongolica</i> <i>Parapoteriostomum schuermanni</i>
Cylicodontophorus Ihle, 1922 <i>Cylicodontophorus bicoronatus</i> <i>Cylicodontophorus reineckeii</i>	Skrjabinodentus Tshoijs, in Popova, 1958 <i>Skrjabinodentus caragandicus</i> <i>Skrjabinodentus longiconus</i> <i>Skrjabinodentus tshoijsi</i>
Caballonema Abuladze, 1937 <i>Caballonema longicapsulatum</i>	Petrovinema Ershov, 1943 <i>Petrovinema poculatum</i> <i>Petrovinema skrjabini</i>
Gyalcephalus Looss, 1902 <i>Gyalcephalus capitatus</i>	Poteriostomum Quiel, 1919 <i>Poteriostomum imparidentatum</i> <i>Poteriostomum ratzii</i>
Tridentoinfundibulum Tshoijs, in Popova, 1958 <i>Tridentoinfundibulum gobi</i>	Hsiungia K'ung & Yang, 1964 <i>Hsiungia pekingensis</i>

4. BIOLOGIA E PATOGENIA DA INFECÇÃO POR ESTRONGILÍDEOS

4.1. Aspectos biológicos

Os strongilídeos são nematodes parasitas do cego e cólon dos equídeos, os quais se infetam por ingestão da forma larvar infetante juntamente com o alimento ou água, durante o pastoreio (Eysker *et al.*, 2007; Bowman, 2009; Bowman *et al.*, 2014).

Os parasitas adultos vivem fixados à mucosa do cego e cólon dos equídeos (Anjos & Rodrigues, 2003; Bowman *et al.*, 2014) sendo o seu padrão de sobrevivência caracterizado pelo parasitismo em grupo com infeções mistas e numerosas espécies num mesmo hospedeiro (Bucknell *et al.*, 1996; Anjos & Rodrigues, 2006), de forma a estabelecer uma comunidade parasitária estável dominada por interações positivas (Warnick, 1992; Matthews, 1998). Esta aparente ausência de competição entre as várias espécies de parasitas (Warnick, 1992) pode explicar o elevado número de formas adultas coexistentes num mesmo hospedeiro (Lyons *et al.*, 2000; Anjos & Rodrigues, 2006). Um único hospedeiro pode apresentar infeções com elevado número de formas adultas e larvares, que podem atingir entre um a três milhões de espécimes por hospedeiro (Lyons *et al.*, 2000).

A densidade de hospedeiros apresenta uma correlação positiva com o número de parasitas, observando-se maior infeção parasitária em equídeos de populações com maior encabeçamento (Arneberg *et al.*, 1998).

Este grupo de parasitas apresenta uma distribuição do tipo binominal negativa nos hospedeiros, em que cerca de 20% dos hospedeiros concentram cerca de 80% dos parasitas, sendo estes os animais com maior poder contaminante da pastagem (Warnick, 1992).

Os strongilídeos dos equídeos apresentam ciclos biológicos diretos ou monoxenos com duas fases de desenvolvimento distintas. Uma fase de desenvolvimento exógeno que corresponde a estádios de vida livre e uma fase de desenvolvimento endógeno correspondendo a estádios de vida parasitária (Bowman, 2009; Bowman *et al.*, 2014).

4.1.1. Ciclo biológico

Desenvolvimento exógeno

O desenvolvimento exógeno corresponde a uma fase pré-parasitária comum a todos os strongilídeos parasitas de equídeos (Bowman *et al.*, 2014). Esta fase inicia-se com a eliminação de ovos para o exterior juntamente com as fezes do hospedeiro e caracteriza-se

pelo desenvolvimento larvar de vida livre, até à forma infetante, a larva L3 ou terceiro estágio de desenvolvimento larvar. Termina com a infeção do hospedeiro por ingestão de formas infetantes juntamente com a pastagem (Madeira de Carvalho, 2006; Eysker *et al.*, 2007; Bowman *et al.*, 2014).

As fêmeas ovíparas, dos nematodes das subfamílias Strongylinae e Cyathostominae, depositam ovos não embrionados, nas primeiras fases de desenvolvimento embrionário (Bowman, 2009; Bowman *et al.*, 2014), geralmente em estágio de mórula (Romero, 1988).

A eliminação dos ovos dos strongilídeos para o exterior com as fezes do hospedeiro ocorre de forma contínua, ao longo do dia, com pequenas variações de número (Bennett, 1999).

O ovo, com forma elíptica regular, apresenta parede fina constituída por uma membrana externa quitinosa e uma membrana vitelina interna. Normalmente existe uma cavidade fluida entre a parede do ovo e a mórula interior. De morfologia muito semelhante entre todos os strongilídeos não é possível distinguir os diferentes ovos das várias espécies, géneros ou subfamílias (Bowman *et al.*, 2014).

O desenvolvimento embrionário é imediato e rápido embora dependa de alguns fatores ambientais como a temperatura, humidade e o teor em oxigénio (Romero, 1988). Segundo Soulsby (1986), estes fatores abióticos, em particular a temperatura e a humidade, condicionam o desenvolvimento do primeiro estágio larvar, a L1, assim como a sua eclosão.

Soulsby (1986) considera que a temperatura ótima de desenvolvimento da L1 é de 26°C, temperatura que permite o seu desenvolvimento em apenas 24 horas. Quando são observadas as condições ótimas de temperatura e humidade a eclosão da L1 ocorre em poucos minutos (Bowman *et al.*, 2014). No entanto a L1 pode desenvolver-se entre os limites mínimo e máximo, respetivamente de 3 e 40°C. Mfítlodze & Hutchinson (1987) referem que as temperaturas próximas dos 4°C induzem um desenvolvimento embrionário nulo, sendo muito lento aos 6 ou 7°C. A estas temperaturas a maioria das larvas interrompe o seu desenvolvimento na fase de pré-eclosão (Mfítlodze & Hutchinson, 1987; Bowman *et al.*, 2014), podendo sobreviver durante várias semanas a temperaturas baixas (Bowman *et al.*, 2014). Van Kolk & Kroeze, 2013, refere que ovos embrionados conservados a -10°C podem originar larvas viáveis ao fim de dez meses. As L1 eclodem quando a temperatura é superior a 8 ou 9°C (Ogbourne & Duncan, 1985; Bowman *et al.*, 2014). Os ovos que não iniciaram o seu desenvolvimento embrionário não sobrevivem a temperaturas inferiores a 0°C (Bowman *et al.*, 2014). Segundo Lucker (1941 *cit. in* Madeira de Carvalho, 2001), os ovos não embrionados morrem em 47 a 56 dias, quando submetidos a temperaturas de -10 a -6°C de forma contínua.

Soulsby (1986) considera que a desidratação é letal para os ovos que não iniciaram o seu desenvolvimento embrionário, no entanto os ovos já embrionados podem permanecer viáveis durante várias semanas, num estado de vida latente.

A L1 caracteriza-se por apresentar um esôfago rabditiforme, sendo a larva do tipo rabditóide. Alimenta-se principalmente de bactérias e protozoários fecais, cresce e entra num estado de letargia que a prepara para uma primeira muda, formando-se o segundo estágio de desenvolvimento larvar, a L2. Esta larva do tipo rabditóide alimenta-se de forma semelhante à L1, cresce rapidamente e torna-se maior do que o estágio de desenvolvimento anterior. Ao atingir o seu comprimento máximo entra novamente num estado de letargia que a prepara para uma segunda muda. Durante a segunda muda a cutícula da L2 desprende-se mas não se separa, permanecendo como uma bainha que envolve a larva do terceiro estágio de desenvolvimento, a L3. Esta larva embainhada é a única que pode infectar o hospedeiro, sendo designada por essa razão larva infetante (Romero, 1988; Bowman *et al.*, 2014).

Quando observadas as condições ótimas de temperatura e humidade o período de desenvolvimento do ovo até à larva infetante pode variar entre os cinco e os sete dias (Blood *et al.*, 1989; Bowman *et al.*, 2014).

A larva infetante do tipo strongilóide, possui uma bainha envolvente, que confere proteção contra as condições ambientais adversas, mas não a deixa alimentar-se a partir do exterior, nutrindo-se através de grânulos de reserva alimentar de glicogénio armazenados nas células intestinais (Romero, 1988; Bowman *et al.*, 2014). Medica & Sukhdeo (1997) observaram que as reservas de ácidos gordos específicos, nas L3 de *Strongylus vulgaris*, são essenciais tanto para o seu movimento no meio ambiente como para a penetração da parede intestinal do hospedeiro. Segundo Soulsby (1986), a L3 morre se não infectar um hospedeiro antes de se esgotarem as suas reservas energéticas.

O comportamento migratório das larvas infetantes, desde a massa fecal até a vegetação circundante, permite aumentar a probabilidade de encontrar um hospedeiro e desta forma iniciar a fase parasitária do ciclo biológico (Ogbourne & Duncan, 1985; Bowman *et al.*, 2014). Esta atividade larvar resulta de tropismos, ou seja, respostas de sinal diverso a vários estímulos externos como a luz, a humidade, a temperatura e a proximidade do solo, respetivamente, fototropismo, higrótropismo, termotropismo e geotropismo (Bowman, 2009; Bowman *et al.*, 2014).

É necessário que haja humidade para que as larvas possam realizar as migrações, visto que não se deslocam sobre superfícies secas. Uma película de água é suficiente para se movimentarem, ou seja, apresentam higrótropismo positivo. A L3 é móvel e apresenta simultaneamente um geotropismo negativo e um fototropismo positivo à luz suave. Desta

forma as L3 sobem a vegetação quando a luz é suave, sobretudo durante a alvorada e ao anoitecer ou durante todo o dia se o tempo estiver coberto com nuvens, expondo-se ao hospedeiro. As L3 reagem ao aumento da temperatura sendo as migrações larvares mais ativas em tempo quente do que em tempo frio, ou seja, têm um termotropismo positivo (Bowman *et al.*, 2014).

Segundo Madeira de Carvalho *et al.* (2005), a maior parte das larvas infetantes (95,0%) desloca-se cerca de 15 centímetros a partir da massa fecal e apenas 5,0% migram até 30 centímetros de distância da massa. Hutchinson *et al.* (1989) referem que 89,0% das larvas infetantes sobe a vegetação até cerca de dez centímetros acima do nível do solo.

A temperatura e humidade, assim como o teor em oxigénio e luz solar direta são fatores abióticos que condicionam o desenvolvimento larvar exógeno dos strongilídeos parasitas de equídeos (Romero, 1988; Bowman *et al.*, 2014).

Os limites de temperatura que permitem o desenvolvimento de um maior número de larvas infetantes são os 20 e 33°C, com valores ótimos entre 25 a 28°C (Bowman *et al.*, 2014).

Segundo Madeira de Carvalho (2001), sabe-se que quanto mais alta for a temperatura mais rápido é o desenvolvimento larvar até ao estágio infetante e que a baixas temperaturas ocorre um atraso no desenvolvimento larvar. Rupasinghe & Ogbourne (1978 *cit. in* Madeira de Carvalho, 2001), referem que a mortalidade larvar é muito elevada quando o seu desenvolvimento ocorre nos limites mínimos e máximos de temperatura viável.

A desidratação do meio ambiente consiste num dos principais fatores letais para as larvas de vida livre, as quais não sobrevivem mais do que alguns dias em ambientes secos (Bowman *et al.*, 2014). English (1979 *cit. in* Madeira de Carvalho, 2001) refere que os estádios larvares pré-infetantes, como a L1 e L2, podem sobreviver longos períodos em fezes secas. Alguns autores têm observado períodos de sobrevivência à secura de 15 meses para L3 do género *Strongylus* (Hassan & Ka-Oud, 1983) e de 19 meses para larvas de ciatostomíneos (Ríos-Centeno *et al.*, 1997). O teor mínimo de humidade relativa necessário para o desenvolvimento de formas infetantes de strongilídeos na massa fecal é de 14,0%, abaixo do qual ocorre uma elevada mortalidade (Mfitilodze & Hutchinson, 1987). Nas pastagens, o microclima criado pela superfície do solo não é tão seco como o ambiente geral, pelo que as larvas podem sobreviver durante mais tempo. Algumas larvas penetram no solo onde sobrevivem mais facilmente do que na superfície. Em solos soltos e arenosos as larvas movimentam-se facilmente, penetrando mais profundamente do que em solos compactos e argilosos (Mfitilodze & Hutchinson, 1988; Bowman *et al.*, 2014).

As L3 podem viver submersas em água durante vários meses, dependendo da temperatura e da presença de organismos prejudiciais (Bowman *et al.*, 2014).

Tendo em conta todos estes fatores, o tempo de vida de uma larva na pastagem é afetado favoravelmente pela humidade relativa elevada, pela luz de fraca intensidade e pela temperatura relativamente baixa. As L3 não se alimentam e contêm reservas alimentares limitadas, estando o seu tempo de vida dependente da sua atividade e consequente desgaste das reservas energéticas. As condições que favorecem a migração como temperaturas elevadas, flutuações frequentes de intensidade da luz e solos de textura grosseira, conduzem a um rápido esgotamento energético e à morte das larvas. As L3 vivem cerca de três meses em climas quentes e secos, embora possam viver mais de um ano em climas frios e húmidos (Bowman *et al.*, 2014).

Os fatores bióticos como a cobertura vegetal do solo, predadores e organismos coprófagos como gastrópodes, anelídeos, ácaros e fungos são determinantes para o desenvolvimento e sobrevivência exógenos dos estádios de vida livre destes parasitas (Sievers *et al.*, 1995).

Desenvolvimento endógeno

Durante o pastoreio e quando bebe água, o equídeo infeta-se por ingestão de larvas infetantes L3 (Romero, 1988; Bowman *et al.*, 2014). A fase de vida parasitária inicia-se no intestino delgado com o desembainhamento, que consiste na libertação da larva infetante da bainha do segundo estado larvar (Bowman *et al.*, 2014) e depende de estímulos físicos e químicos específicos do intestino delgado (Ogbourne & Duncan, 1985). De acordo com Poynter (1954 *cit. in* Madeira de Carvalho, 2001), a flora microbiana de coliformes tem um importante papel indutor no desembainhamento das L3 dos strongilídeos parasitas de equídeos.

O desembainhamento ocorre em duas fases. Durante a primeira fase os compostos não ionizados, do tampão bicarbonato-dióxido de carbono, presentes no quilo intestinal do hospedeiro, estimulam a produção enzimática, de lipases e de leucina aminopeptidase, por parte da L3. Numa segunda fase estas enzimas atuam sobre um substrato localizado numa área específica do interior da bainha, num raio de 20 micrómetros junto à extremidade anterior da larva, provocando a sua rutura em cerca de 90 minutos. Após a separação da extremidade anterior da bainha ou a formação de uma fissura longitudinal na zona esofágica, a larva L3 pode sair livremente com os seus próprios movimentos (Ogbourne & Duncan, 1985; Bowman *et al.*, 2014).

Segundo Soulsby (1986) e Romero (1988), os strongilídeos, parasitas dos equídeos, apresentam uma fase parasitária do seu ciclo biológico com diferentes desenvolvimentos endógenos. De acordo com os autores, os strongilídeos podem apresentar um desenvolvimento endógeno complexo com migrações em vários órgãos do organismo

hospedeiro, como por exemplo o género *Strongylus*, ou desenvolverem-se apenas na mucosa e submucosa do intestino grosso, como os ciatostomíneos.

4.1.2. Subfamília Strongylinae, os grandes estrongilídeos

No seu desenvolvimento endógeno as formas larvares das espécies do género *Strongylus* fazem migrações complexas no organismo hospedeiro podendo causar lesões graves (Bowman *et al.*, 2014). As larvas que migram para diferentes partes do corpo do hospedeiro, originando localizações erráticas, perdem-se para o ciclo biológico. Apenas as larvas que completam a sua migração, alcançando o intestino grosso, conseguem formar adultos no lúmen do cego e cólon (Romero, 1988).

Os adultos são parasitas hematófagos e histófagos da mucosa do cólon e cego dos equídeos (Van Kolk & Kroeze, 2013; Beveridge *et al.*, 2014).

Strongylus vulgaris

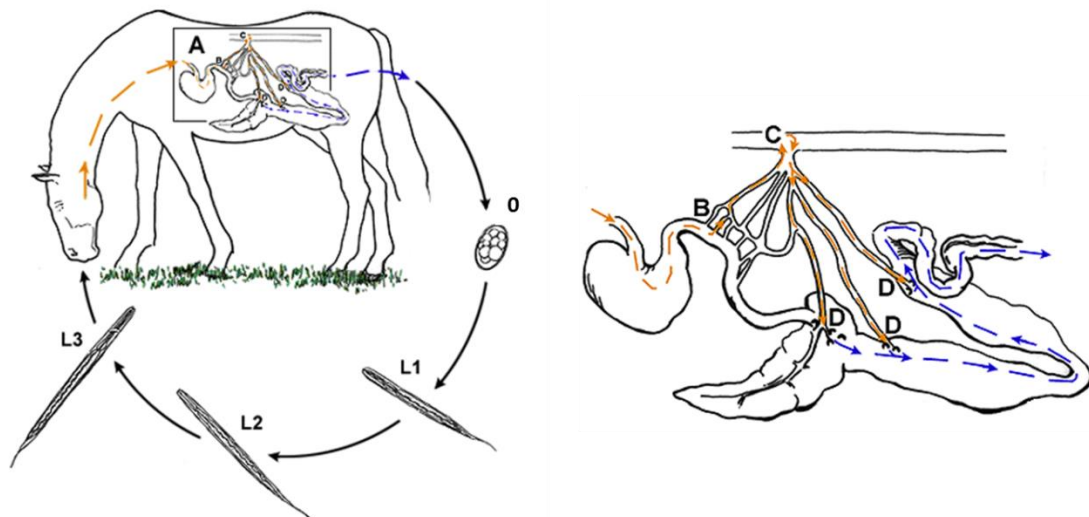
O desenvolvimento endógeno de *Strongylus vulgaris* só foi cabalmente esclarecido na década de 1970 e para a sua descrição são basilares os trabalhos de Ogbourne & Duncan (1985) e Soulsby (1986).

As L3 infetantes são ingeridas com o alimento ou a água de bebida e perdem a bainha no intestino delgado. Em dois dias as larvas infetantes perfuram a parede do intestino delgado, cego e cólon. Passados cerca de oito dias após a infeção mudam para L4 na submucosa. As L4 atravessam a íntima das arteríolas da submucosa e migram contra a corrente sanguínea, formando sulcos no endotélio da parede arterial, através das artérias intestinais cólica e cecais, até atingirem a artéria mesentérica cranial, para onde convergem todas as larvas. Durante esta migração os sulcos formados são cobertos por fibrina e posteriormente dão origem a trombos, responsáveis por acidentes trombo-embólicos, principalmente a nível gastrointestinal.

As L4 podem ser observadas na artéria mesentérica cranial, 14 dias após a infeção e aí podem permanecer cerca de três a quatro meses, associadas a trombos e a aneurismas. Por volta dos 45 dias de permanência na artéria mesentérica, as L4 iniciam a muda para L5, as quais mantêm a bainha da L4. A sua presença está associada a um aumento das lesões arteriais e consequente inflamação e engrossamento das paredes vasculares arteriais, com desenvolvimento de aneurismas e trombose arterial. As L5 perdem a bainha das L4, desenvolvendo-se em adultos imaturos, e iniciam uma migração descendente pelo lúmen do sistema arterial intestinal até à fase serosa do cego e cólon onde, no interior das arteríolas,

formam nódulos e completam a muda final. Os jovens adultos imaturos roturam os nódulos parasitários e libertam-se para o lúmen do intestino grosso onde maturam, durante cerca de seis a oito semanas, e iniciam a produção de ovos aos seis a sete meses após infecção, sendo este o período pré-patente.

Figura 2 - Representação esquemática do ciclo biológico, com o desenvolvimento exógeno e endógeno, de *Strongylus vulgaris* (Adaptado de http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Strongls/strong_8a1.htm).



A - Desenvolvimento endógeno; **B** - L4 atravessam na íntima das arteríolas da submucosa; **C** - L4 e L5 na artéria mesentérica cranial; **D** - L5 formam nódulos e na serosa do ceco e cólon; **O** - Ovo; **L1** - Larva do primeiro estágio de desenvolvimento; **L2** - Larva do segundo estágio de desenvolvimento; **L3** - Larva do terceiro estágio de desenvolvimento.

Strongylus equinus

Desenvolvimento endógeno de *Strongylus equinus* segundo McCraw & Slocombe (1985) e Soulsby (1986).

A L3 desembainha e atravessa a mucosa e submucosa do íleo, ceco e cólon até à subserosa, onde forma nódulos serosos. Cerca de 11 dias a 15 dias após a infeção desenvolve-se, no nódulo, o quarto estágio larvar, a L4 migra através da cavidade peritoneal até atingir o fígado, onde permanece de seis a 17 semanas. Cerca de 15 semanas após infeção ocorre a muda para L5, as que abandonam o fígado pelos ligamentos hepáticos e através do pâncreas voltam à cavidade peritoneal. As larvas que não completaram a última muda no fígado concluem-na no pâncreas. As L5 dirigem-se para o intestino grosso através do hiato de Winslow e ao encontrarem o ceco e cólon perfuram a parede formando nódulos parasitários, o que ocorre cerca de trinta semanas após a infeção. Os adultos imaturos envolvidos pelos nódulos da

parede do cólon deslocam-se até ao lúmen intestinal onde maturam. Em cerca de dez meses é possível observar fêmeas adultas com ovos férteis, sendo este o período pré-patente.

Strongylus edentatus

Desenvolvimento endógeno de *Strongylus edentatus* segundo McCraw & Slocombe (1978) e Soulsby (1986).

As L3 perfuram até a submucosa da parede do cego e cólon ventral. Invadem vénulas e iniciam a migração venosa até ao fígado, através do sistema porta. Dois dias após a infeção as L3 atingem o fígado onde formam nódulos e mudam para L4, cerca de 11 a 18 dias após infeção. As L4 migram pelo parênquima hepático durante cerca de 9 semanas e através dos ligamentos hepáticos saem do fígado. A partir das 17 semanas após infeção é frequente observar L4 nos ligamentos hepáticos hépato-renal, falciforme, redondo e triangular direito assim como no tecido conjuntivo subperitoneal parietal do flanco abdominal direito, onde originam nódulos hemorrágicos, na zona peri-renal e também subpleural. A muda para L5 ocorre cerca de 16 semanas após infeção a nível dos flancos, gordura peri-renal, ligamento hépato-renal e na base do cego, onde há formação de nódulos purulentos. As L5 migram via subperitoneal, entre os cordões do mesocólon, para o intestino grosso e às 36 semanas após infeção as L5 atingem a zona de aderência entre a base do cego e a parede abdominal, penetram na parede cecal e cólica onde produzem nódulos hemorrágicos. Os parasitas jovens adultos atingem o lúmen intestinal onde maturam ao longo de mais um mês. A produção de ovos ocorre cerca de 11 meses após ter ocorrido a infeção, o seu período pré-patente.

Géneros *Triodontophorus*, *Oesophagodontus* e *Craterostomum*

Os restantes géneros agrupados na subfamília Strongylinae são parasitas intestinais de equídeos que não fazem migrações complexas como o género *Strongylus* (Bowman *et al.*, 2014). São exemplo os géneros *Triodontophorus*, *Oesophagodontus* e *Craterostomum* (Lichtenfels *et al.*, 2008).

O desenvolvimento endógeno destes strongilíneos inicia-se com a ingestão das formas infetantes L3 que após o desembainhamento perfura a mucosa do intestino grosso. A migração dos estádios larvares ainda não é bem conhecida mas sabe-se que está limitada à parede do cego e cólon (Van Kolk & Kroeze, 2013; Beveridge *et al.*, 2014).

O género *Triodontophorus* está relacionado com zonas de ulceração hemorrágica do intestino grosso frequentemente rodeadas por parasitas adultos. As formas larvares provavelmente desenvolvem-se nestas lesões (Van Kolk & Kroeze, 2013; Bowman *et al.*, 2014).

Do ponto de vista biológico as espécies dos géneros *Craterostomum* e *Oesophagodontus* assemelham-se com as do género *Triodontophorus* e o desenvolvimento endógeno destes strongilíneos é considerado idêntico aos dos ciatostomíneos (Beveridge *et al.*, 2014; Bowman *et al.*, 2014).

4.1.3. Subfamília Cyathostominae, os pequenos strongilídeos

As numerosas espécies de ciatostomíneos caracterizam-se por apresentarem um desenvolvimento endógeno simples, apenas com migrações na parede do cego e cólon (Anjos & Rodrigues, 2006; Beveridge *et al.*, 2014; Bowman *et al.*, 2014).

As L3 infetantes são ingeridas com a pastagem e após se desembainharem perfuram a parede do cego e cólon maior, entre as criptas de Lieberkuhn, até à mucosa ou submucosa, dependendo da espécie, onde enquistam. Durante o desenvolvimento de L3 para L4 as larvas são envolvidas por fibroblastos os quais formam quistos fibrosos de paredes espessas. As L4 emergem da mucosa e no lúmen do intestino grosso originam as L5 que maturam até adultos (Baudena, 2003; Beveridge *et al.*, 2014).

Segundo Ogbourne (1978), os ciatostomíneos que apresentam um desenvolvimento larvar no interior da mucosa emitem a L4 para o lúmen intestinal, como é exemplo o género *Cylicostephanus*. Os que se desenvolvem na submucosa podem emitir o último estágio de desenvolvimento larvar, a L5, como os géneros *Cylicocyclus* e *Gyalocephalus*.

Reinemeyer (1986) refere que a localização do desenvolvimento larvar ocorre a montante da localização preferencial dos parasitas adultos. Segundo o autor, cerca de 57% das larvas desenvolvem-se no cego, 41% no cólon ventral e apenas 2% no cólon dorsal. Apenas 1 a 10% dos adultos se localizam no cego, 50 a 55% no cólon ventral e cerca de 45% no cólon dorsal.

O período pré-patente pode variar entre as seis e as 18 semanas e depende da idade e imunidade dos hospedeiros. Este período pode ser mais alongado se ocorrer inibição do desenvolvimento larvar ou hipobiose (Beveridge *et al.*, 2014).

Segundo Lyons *et al.* (1994), esta fase de interrupção do desenvolvimento larvar permite sincronizar o desenvolvimento do parasita com as alterações ambientais, de forma a assegurar a sua sobrevivência quando as condições ambientais forem desfavoráveis.

Os estímulos indutores da hipobiose são de carácter sazonal (Fernández *et al.*, 1999). Se as condições ambientais desfavoráveis atuarem sobre os estádios larvares infetantes dos ciatostomíneos, estes iniciam a hipobiose após infeção do hospedeiro (Love *et al.*, 1999). A

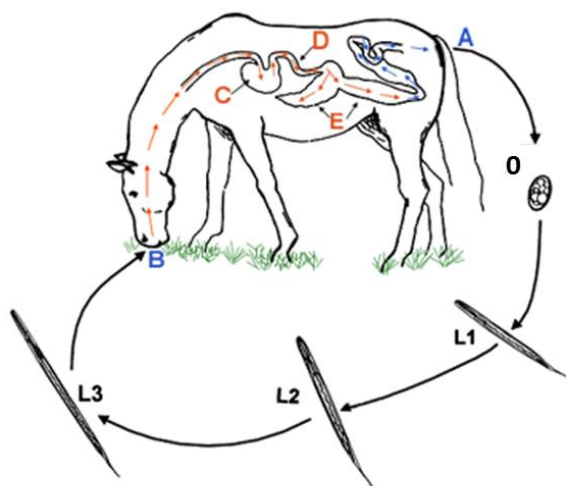
maioria das L3 ingeridas por equídeos, no fim do verão e durante o outono, inicia um período de dormência que pode durar até dois anos e meio (Eysker *et al.*, 1990)

Segundo Jankovska *et al.* (2000), os estímulos que determinam a duração e o fim do período de hipobiose ainda não são bem conhecidos. No entanto Lyons *et al.* (1994), Love *et al.* (1999) e Baudena (2003) referem que este mecanismo de sobrevivência dos ciatostomíneos é condicionado, não só pelas condições ambientais e imunidade do hospedeiro, como também pelo grau de infecção do hospedeiro. Uma elevada densidade de ciatostomíneos adultos no lúmen do intestino grosso inibe, por mecanismos de retroação desconhecidos, a maturação das larvas em hipobiose e consequentemente aumenta este período.

Segundo Lyons *et al.* (2000), a hipobiose é um mecanismo de quiescência complexo de três subpopulações de larvas enquistadas. A larva infetante perfura a parede do cego e cólon ventral, até à mucosa ou submucosa, onde se enquista. A larva inicial do terceiro estágio (LI3), primeira subpopulação de larvas enquistadas, cresce e desenvolve-se em larva tardia do terceiro estágio (LT3), que permanece em hipobiose até originar a larva do quarto estágio em desenvolvimento (LD4), a última subpopulação de larvas enquistadas. A LD4 emerge para o lúmen intestinal e desenvolve-se até LT4, larva tardia do quarto estágio, que sofre a uma última muda para L5 e matura até adulto.

Após o período de hipobiose a irrupção das larvas para o lúmen intestinal apresenta características sazonais ocorrendo sobretudo durante o inverno e início da primavera (Giles *et al.*, 1985; Reinemeyer *et al.*, 1986). A formação de um elevado número de parasitas adultos, no fim do inverno e início da primavera é responsável pelos aumentos sazonais do número de ovos de ciatostomíneos eliminados nas fezes dos equídeos durante esta época do ano (Reinemeyer, 1986).

Figura 3 - Representação esquemática do ciclo biológico dos Cyathostominae (Adaptado de http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Strongls/strong_9a1.htm).



A - Eliminação dos ovos para o exterior juntamente com as fezes do hospedeiro; **B** - Infecção do hospedeiro por ingestão de L3 com a pastagem; **C** - Desembainhamento da L3; **D** - Trajeto das L3 até ao ceco e cólon; **E** - Desenvolvimento larvar na parede do ceco e cólon e formação de indivíduos adultos; **O** - Ovo; **L1** - Larva do primeiro estágio de desenvolvimento; **L2** - Larva do segundo estágio de desenvolvimento; **L3** - Larva do terceiro estágio de desenvolvimento.

4.2. Patologia e clínica

4.2.1. Infecção por estrongilídeos

Os equídeos podem infetar-se desde o momento do nascimento, por ingestão de formas infantantes presentes no meio ambiente, no entanto apenas eliminam ovos pelas fezes a partir das sete ou oito semanas de idade. Com o aumento da idade os equídeos desenvolvem resistência à infecção, podendo apresentar infecções intensas sem contudo apresentar sintomatologia. Passam a constituir uma fonte de infecção para os animais mais jovens (Pietrement, 2004; Bowman *et al.*, 2014).

As infecções por estrongilídeos são mistas sendo os sinais clínicos gerais o resultado da ação coletiva dos vários parasitas (Madeira de Carvalho, 2006; Bowman *et al.*, 2014).

Romero (1988) refere que do ponto de vista clínico a infecção por estrongilídeos é caracterizada por uma síndrome anémica, digestiva e circulatória, dependendo da espécie dominante e do seu grau de patogenicidade. Soulsby (1986) considera que o grau de doença também depende do número de parasitas envolvidos assim como do estado físico e nutricional do hospedeiro, podendo ocorrer a sua morte.

Geralmente os sinais clínicos desenvolvem-se lentamente. As fezes tornam-se moles, ocorrendo um processo diarreico, com diminuição do apetite e emagrecimento, os animais cansam-se facilmente e o pêlo torna-se áspero. Ocorre anemia, que pode ser grave, associada a edema abdominal e dos membros (Bowman *et al.*, 2014).

4.2.1.1. Subfamília Strongylinae

Os parasitas adultos das várias espécies do género *Strongylus* são hematófagos e histófagos e fixam-se à mucosa do intestino grosso exercendo uma ação traumática, irritativa e espoliadora (Beveridge *et al.*, 2014; Bowman *et al.*, 2014). As lesões causadas pelos parasitas adultos consistem em pequenas úlceras superficiais hemorrágicas, que podem confluir e originar áreas ulceradas mais extensas. O elevado número de úlceras, superior ao número de parasitas adultos, sugere uma alteração periódica dos seus pontos de fixação (Bowman *et al.*, 2014). A ação antigénica e inflamatória promove um aumento da vasodilatação capilar da mucosa com infiltração de células inflamatórias e com libertação de mediadores da dor e da estimulação nervosa, o que aumenta a motilidade intestinal (Austin, 1994; Klei, 2001).

Segundo Beugnet (1998), devido às ações dos estrongilídeos adultos pode ocorrer atraso no crescimento com aumento do apetite, cólicas com diarreia e anemia. Soulsby (1986) refere que em infeções intensas a anemia pode ser normocítica normocrómica, associada a um baixo número de eritrócitos e a um aumento da taxa catabólica albuminoídea.

As larvas do género *Strongylus* são responsáveis pelas principais ações patogénicas originando lesões graves (Reinemeyer & Nielsen, 2013). As lesões primárias na parede do intestino grosso são causadas pela penetração da L3 e sua migração pela mucosa e submucosa (Bowman *et al.*, 2014).

Strongylus vulgaris

O desenvolvimento endógeno larvar de *Strongylus vulgaris* está associado a lesões no sistema arterial, especialmente da artéria mesentérica craneal e dos seus ramos principais. Ocorrem lesões inflamatórias com endoarterites, aneurismas e formação de trombos associados à ocorrência de cólicas graves (Reinemeyer & Nielsen, 2013; Beveridge *et al.*, 2014).

Segundo Romero (1988), durante a migração larvar na íntima dos vasos ocorre uma ação mecânica, traumática e espoliadora. Os estádios larvares segregam toxinas indutoras de pirexia e depressão do sistema nervoso central, assim como podem introduzir bactérias na corrente sanguínea, as quais podem causar septicemia.

Normalmente não ocorrem embolias maciças necessárias para promover enfartes agudos fatais, visto que os aneurismas da artéria mesentérica craneal ocorrem lentamente permitindo a formação de circulação colateral (Bowman *et al.*, 2014). Contudo podem ocorrer cólicas muito dolorosas, volvos intestinais, enfartamento, vasoconstrição periférica ou ruptura de aneurismas com hemorragia interna e morte súbita (Beveridge *et al.*, 2014).

Ogbourne & Duncan (1985) referem a ocorrência de alterações sistêmicas associadas a embolias. Segundo os autores pode ocorrer claudicação por embolia das artérias ilíacas, assim como orquite por embolia da artéria espermática ou mesmo a morte súbita do equídeo por enfarte (embolia das artérias coronárias) ou por isquemia cerebral (embolia das artérias carótidas).

Strongylus equinus

As migrações larvares de *Strongylus equinus* originam desordens funcionais do fígado e pâncreas pela ação traumática, mecânica, irritativa e tóxica das larvas em desenvolvimento (Van Kolk & Kroeze, 2013). É frequente observar hepatite com trajetos parasitários hemorrágicos e fibrosos e pancreatite com nódulos fibrosos (Reinemeyer & Nielsen, 2013; Bowman *et al.*, 2014) assim como focos inflamatórios hemorrágicos peritoneais (Van Kolk & Kroeze, 2013). Os sinais clínicos consistem em cólicas, anorexia e mau estado geral (Bowman *et al.*, 2014).

Strongylus edentatus

As migrações hepatoperitoneais das fases larvares de *Strongylus edentatus* podem originar forte dor abdominal, hipertermia, prostração e anemia devido a hepatite e peritonite graves (Beveridge *et al.*, 2014). A cavidade peritoneal pode acumular grande quantidade de fluido hemorrágico com depósitos fibrinosos sobre o peritoneu (Reinemeyer & Nielsen, 2013; Bowman *et al.*, 2014). As larvas que migram para a região subperitoneal do flanco direito produzem nódulos hemorrágicos que podem originar hemorragias intraperitoneais fatais (Beveridge *et al.*, 2014; Ducos de Lahitte & Havrileck, 1990).

4.2.1.2. Subfamília Cyathostominae

Os ciatostomíneos encontram-se frequentemente em grande número no cego e cólon dos equídeos (Bowman *et al.*, 2014) e são agentes de ciatostomínoses (Lyons *et al.*, 2000; Eysker *et al.*, 2007).

A ciatostominose tipo um (I) é uma tiflocolite de carácter estival que ocorre devido à presença de parasitas adultos no lúmen do intestino grosso assim como pela penetração das L3 na mucosa e acumulação progressiva de larvas em hipobiose durante a época de pastoreio (Beveridge *et al.*, 2014).

Romero (1988) considera que as larvas dos ciatostomíneos exercem uma forte ação traumática, mecânica e espoliadora durante todo o seu desenvolvimento parietal.

Collobert *et al.* (1996) observaram que a mucosa do intestino grosso pode apresentar-se espessada e congestionada, com nódulos em diferentes estádios de desenvolvimento, e por vezes ulcerada com parasitas adultos fixos.

Romero (1988) refere que os ciatostomíneos adultos exercem uma ação traumática, histófaga e hematófaga ao se fixarem à mucosa para se alimentarem. Ao deixarem o local de alimentação formam pequenas úlceras que perdem sangue pela ação anticoagulante de substâncias segregadas assim como substâncias hemolíticas e tóxicas enterotropas.

Esta síndrome caracteriza-se pela presença de diarreia intermitente, hipertermia, picacismo, cólicas ligeiras, mau estado do pêlo e má condição corporal do animal. Com a sua progressão e cronicidade, as cólicas passam a ser mais frequentes e pode ocorrer anemia, emagrecimento progressivo e acentuado, edemas nas zonas de declive e caquexia na fase final da evolução da parasitose, que pode terminar com a morte do animal (Bowman *et al.*, 2014).

A ciatostominose larvar ou ciatostominose tipo dois (II) consiste numa síndrome mais grave do que a ciatostominose tipo I e ocorre devido à maturação sazonal de larvas hipobióticas no fim do inverno e primavera, de janeiro a maio (Lyons *et al.*, 2000).

A irrupção simultânea das formas larvares hipobióticas pode causar uma extensa destruição tissular e ulceração da mucosa do cego e cólon, causando cólicas e diarreia por vezes de carácter agudo e hemorrágico (Paul, 1998; Davidson *et al.*, 2005; Bowman *et al.*, 2014).

Esta síndrome é mais frequente em animais jovens, com idade inferior a cinco anos, que utilizem a pastagem juntamente com outros equídeos e pode apresentar uma taxa de mortalidade elevada, cerca de 50% (Lyons *et al.*, 2000; Proudman & Matthews, 2000).

Em ambas as formas de ciatostominose pode ocorrer leucocitose por neutrofilia ou linfocitose, hipoproteinemia com hipoalbuminemia ou hiperproteinemia com hiperglobulinemia, com aumento das alfa-1 (α_1) e beta-1 (β_1) globulinas, e variações dos níveis de fibrinogénio (Lyons *et al.*, 2000; Klei, 2001). No entanto, parece não existirem mecanismos inflamatórios específicos associados à ciatostominose larvar e a resposta inflamatória sistémica a tratamentos anti-helmínticos parece ser pouco expressiva (Nielsen *et al.*, 2013a).

Medeiros *et al.* (2011) observam que o elevado número de linfócitos, histiócitos e eosinófilos, pode estar associado a reações de hipersensibilidade cutânea observadas em infecções por *estrongilídeos*.

Lyons *et al.* (2000) consideram que a *ciatostominose* é a *helminose* emergente mais importante nos equídeos.

5. IMPORTÂNCIA DAS PARASIToses GASTROINTESTINAIS EM ASININOS

O parasitismo gastrointestinal é muito frequente em asininos e em condições naturais de pastoreio. Em algum momento do seu desenvolvimento, os asininos encontram-se parasitados (Madeira de Carvalho, 2006; Bowman *et al.*, 2014).

A interpretação da epidemiologia e patogenia das diferentes espécies de *helminthes* parasitas de asininos, é normalmente realizada a partir de suposições sobre o atual conhecimento das parasitoses de cavalos (Umur & Acici, 2009; Waqas *et al.*, 2015).

Segundo Javed *et al.* (2014), a negligência das medidas de manejo adequadas e a ausência de programas de controlo parasitário eficazes, aumentam a importância das parasitoses em asininos. Waqas *et al.* (2015) referem que o parasitismo interno associado ao trabalho forçado, stresse e má nutrição pode prejudicar gravemente a saúde, causando a morte dos asininos.

Segundo Asefa *et al.* (2011) e Chitra *et al.* (2011), os prejuízos da parasitose dependem da espécie e quantidade de parasitas assim como da idade, estado nutricional e imune do hospedeiro. Os autores referem que o parasitismo negligenciado pode estar associado a quadros clínicos graves e mortalidade, em animais jovens. Waqas *et al.* (2015) observam que a biodiversidade e taxa de infecção parasitária dependem amplamente da área geográfica, e fatores agro-ecológicos associados, assim como a programas de desparasitação.

Getachew *et al.* (2010) referem que a esperança média de vida dos asininos está relacionada com o grau de infecção parasitária por *helminthes*. Halliday (2010) refere que um asinino saudável pode viver entre 25 a 40 anos, dependendo do seu estilo de vida. Segundo Svendsen (1997) os asininos sujeitos a cuidados veterinários regulares têm uma esperança média de vida superior a 37 anos, enquanto os asininos nunca sujeitos a qualquer intervenção veterinária vivem, em média, menos do que 12 anos. Svendsen (1991) observou que a esperança média de vida dos asininos nos países mediterrânicos é baixa, onde apenas 11,0% dos asininos vive mais de 15 anos. O autor associou a baixa esperança de vida dos asininos da região mediterrânica à ausência de cuidados veterinários básicos como o controlo parasitário.

As infecções parasitárias são frequentes em asininos e exercem um impacto negativo na saúde e bem-estar animal, assim como na sua capacidade de trabalho e condição corporal (Yoseph *et al.*, 2005; Swann, 2006; Getachew *et al.*, 2010; Krecek, 2014a). Pearson & Ouassat (1996) e Geiger, (2013), observaram uma melhoria significativa da condição corporal e no bem-estar dos asininos sujeitos a tratamento antiparasitário.

O tratamento das infecções parasitárias é particularmente importante em asininos por ter um efeito benéfico na sua capacidade de trabalho (Morriss *et al.*, 2004; Curran *et al.*, 2005; Krecek & Waller, 2006; Krecek, 2014a).

As doenças parasitárias têm um impacto financeiro negativo sobre os proprietários de asininos devido às perdas por baixa fertilidade, reduzido potencial de trabalho e elevado custo do tratamento (Waqas *et al.*, 2015).

Asefa *et al.* (2011) e Morrow *et al.* (2011), referem a ocorrência de elevada biodiversidade e densidade de parasitas gastrointestinais nos asininos. O exame *post-mortem* destes hospedeiros revelou a presença de 16,0% de infecções parasitárias mistas, de até dez espécies diferentes de parasitas em simultâneo, com contagens gerais de 266 a 14112 parasitas, com uma média de 1597 parasitas por animal.

Os asininos (*Equus asinus*) são hospedeiros naturais de parasitas gastrintestinais do cavalo (*Equus caballus*) e assumem um importante papel, como hospedeiros assintomáticos disseminadores, na transmissão de infecções parasitárias para o cavalo (Soulby, 1986; Medica *et al.*, 2001; Umur & Acici, 2009; Krecek, 2013, 2014a).

Os nematodes strongilóides, ascarídeos, oxiurídeos, tricostrongilídeos, strongilídeos e cestodes anoplocefalídeos, são exemplos de parasitas transmitidos entre as diferentes espécies de equídeos (Trawford, 2004; Matthews *et al.*, 2004a).

Os autores referem que a prevalência de infecções parasitárias e a biodiversidade de helmintes parasitas gastrointestinais diferem com a faixa etária do asinino (Chitra *et al.*, 2011; Bowman *et al.*, 2014), referindo que várias espécies de nematodes infetam os equídeos mas que a prevalência destas espécies é geralmente menor do que a de strongilídeos (Relf *et al.*, 2013).

Chitra *et al.* (2011) observaram um aumento da prevalência de infecção por parasitas gastrointestinais em asininos até aos oito anos de idade e uma diminuição nos animais mais velhos. Considerando os grupos etários, com idade inferior a meio ano (<0,5); entre meio a três anos (0,5 a 3); superior a três anos e até oito anos (>3 a 8); e superior a oito anos (>8), os autores registaram prevalências de infecções parasitárias de 66,7%, 78,5%, 83,3% e 76,2%, respetivamente. Os mesmos autores observaram ligeiras diferenças na biodiversidade de helmintes parasitas gastrointestinais de asininos. Neste estudo o parasitismo por strongilóides foi maior em animais jovens e ausente em animais idosos, registando-se as

prevalências de 16,7%, 12,5%, 5,6% e 0,0% nas diferentes faixas etárias consideradas pelos autores. Os ascarídeos foram mais prevalentes em asininos com idade compreendida entre o meio ano e os oito anos, como mostram as prevalências de 8,3%, 18,8%, 27,8%, 4,8% e 14,9%, observadas. O parasitismo por *strongilídeos* foi elevado, observando-se um aumento, até aos três anos de idade, seguido de uma estabilização ao longo das restantes faixas etárias, como revelam as prevalências registadas de 66,7%, 87,1%, 77,8%, 71,4% e 76,1%.

Strongyloides westeri parasita o intestino delgado de equídeos com idade inferior a seis meses. O parasita é transmitido via lactogénica, da burra para o burrango, e a infeção tende a desaparecer espontaneamente com a idade (Trawford & Mulugeta, 2008; Araujo *et al.*, 2012). Segundo Wells *et al.* (1998), a infeção por *Strongyloides westeri* é pouco frequente em animais adultos e quando ocorre apresenta níveis de infeção muito baixos. Vários autores referem prevalências de infeção por *Strongyloides westeri*, em animais com idade superior a seis meses, de 30,0% (Wells *et al.*, 1998), 28,6% (Wannas *et al.*, 2012), 20,0% (Ibrahim *et al.*, 2011) e de 8,0% (Chitra *et al.*, 2011; Getachew *et al.*, 2010).

A infeção por *Parascaris* é frequentemente observada em equídeos jovens, entre os três e os nove meses de idade (Soulby, 1986; Bowman *et al.*, 2014). Podem ocorrer em grande número, o que pode explicar a ocorrência de asininos de baixa estatura (Khallaayoune, 1991), podendo causar obstrução ou perfuração do intestino delgado e morte do asinino (Asefa *et al.*, 2011; Krecek, 2013, 2014a). A prevalência de infeção por *Parascaris* decresce com a idade, provavelmente devido ao desenvolvimento de imunidade contra estes parasitas (Wells *et al.*, 1998). No entanto, Getachew (2006) refere prevalências de infeção crescentes com a idade, observando uma prevalência de 5,2% (42/803) em asininos com idade inferior a dois anos e meio (<2,5), prevalências de 9,1% (73/803) e 8,7% (70/803) em asininos com idades compreendidas entre os dois anos e meio e os quatro anos e meio (2,5-4,5) e entre os quatro anos e meio e os oito anos (4,5-8), respetivamente, e de 28,0% (225/803) em asininos com mais de oito anos de idade (>8). Getachew *et al.* (2010), Chitra *et al.* (2011), Wannas *et al.* (2012), Mezgebu *et al.* (2013) e Tsegaye & Chala, (2015), referem prevalências de infeção, entre 19,9% e 42,3%, por *Parascaris equorum* em asininos adultos, com idade superior a dois anos e meio. Trawford & Mulugeta (2008), sugerem que os asininos não desenvolvem imunidade eficaz contra a infeção por ascarídeos.

Oxyuris equi é muito comum em asininos adultos causando prurido perineal, particularmente em machos (Khallaayoune, 1991; Wells *et al.*, 1998). Os autores referem prevalências de infeção entre os 2,0% e 31,8% (Getachew *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2011; Wannas *et al.*, 2012; Mezgebu *et al.*, 2013; Tsegaye & Chala, 2015).

Trichostrongylus axei é referido como parasita gástrico frequente em asininos quando em pastoreio conjunto com ruminantes e equinos (Madeira de Carvalho & Afonso-Roque, 1995; Trawford & Mulugeta, 2008). Segundo Wells *et al.* (1998), os asininos jovens, com idade inferior a seis meses, apresentam frequentemente uma elevada prevalência de infeção por *Trichostrongylus axei*. Tolliver *et al.* (1985) e Pandey & Eysker, (1988), referem prevalências de 100%, no entanto, Wannas *et al.* (2012) e Filho *et al.* (2013) referem valores de prevalência de infeção entre os 17,9% e os 29,0%, em animais adultos, entre os dois e seis anos de idade.

Segundo Fikru *et al.* (2005), Getachew *et al.* (2010) e Getachew *et al.* (2012), a infeção de asininos por cestodes anoplocefalídeos é frequentemente observada em todo o mundo, com taxas de infeção entre os 8,0% e os 40,0%. Trawford & Mulugeta (2008) referem que *Anoplocephala perfoliata* é a espécie mais comum em asininos e que, embora o efeito patogénico da infeção ainda não esteja bem estudado, são observadas lesões similares às descritas nos equinos, particularmente as ulcerações da junção ileocecal.

5.1. Aspectos epidemiológicos da estrongilidose asinina

De acordo com Love & Duncan (1991) e Lichtenfels *et al.* (1998), são conhecidas cerca de 70 espécies de estrongilídeos parasitas intestinais de equídeos. Bucknell *et al.* (1996) refere que este grupo pode constituir de 67 a 100% do total de nematodes intestinais presentes num mesmo equídeo.

Bucknell *et al.* (1996) e Lyons *et al.* (2000), referem a ocorrência de infeções mistas, com mais de 20 espécies diferentes de estrongilídeos num mesmo hospedeiro.

Segundo Bell *et al.* (2001), os asininos jovens e debilitados assim como as fêmeas são mais suscetíveis às infeções parasitárias por estrongilídeos. Yilma *et al.* (1991) e Ayele *et al.* (2006), referem que as parasitoses intestinais causadas pelos grandes e pequenos estrongilídeos são as que mais debilitam o estado geral dos asininos. Duffield *et al.* (2002) observam que, a maioria das cólicas fatais observadas em asininos são causadas por infeções por estrongilídeos.

Dentro da grande biodiversidade e complexidade da população de estrongilídeos parasitas de asininos, os ciatostomíneos são os mais comuns, correspondendo a 95-100% da carga parasitária total (Sewell, 1990; Matthee *et al.*, 2002a; Morris *et al.*, 2004; Peregrine *et al.*, 2006; Nielsen, 2012), os mais numerosos e diversificados, incluindo mais de 50 espécies conhecidas (Krecek, 2014a). Apesar do género *Cyathostomum* ser o mais frequente, também

se observam outros gêneros como *Cylicocyclus*, em particular as espécies *Cylicocyclus auriculatus* (Matthee *et al.*, 1998) e *Cylicocyclus asini* (Matthee *et al.*, 2002a).

Os estrongilídeos parasitas de asininos são frequentes em regiões do mundo com características geográficas e climáticas muito diversas. Surpreendentemente, os autores referem prevalências de infecção consistentemente elevadas e biodiversidade semelhante, observando-se as mesmas espécies dominantes independentemente da ampla diferença de climas, continentes e regiões do globo (Asefa *et al.*, 2011; Nielsen, 2012; Waqas *et al.*, 2015). Na Etiópia, os estudos de Getachew (2006), Getachew *et al.* (2010), Ibrahim *et al.* (2011), Mezgebu *et al.* (2013), Tesfu *et al.* (2014), Tsegaye & Chala, (2015) e Sheferaw & Alemu (2015), revelaram prevalências de infecção por estrongilídeos de 100%, 99,0%, 98,5%, 87,8%, 78,5%, 84,9% e 100%, respetivamente.

Getachew *et al.* (2010) identificou 24 espécies de estrongilídeos das quais 29,0% (7/24) foram espécies de estrongilíneos (*Strongylus vulgaris*, *Strongylus edentatus*, *Strongylus equinus*, *Triodontophorus serratus*, *Triodontophorus brevicauda*, *Triodontophorus tenuicollis* e *Oesophagodontus robustus*) e 71,0% (17/24) foram ciatostomíneos (*Cyathostomum catinatum*, *Cyathostomum tetracanthum*, *Cyathostomum montgomeryi*, *Coronocyclus coronatus*, *Coronocyclus labiatus*, *Coronocyclus labratus*, *Cylicocyclus auriculatus*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicocyclus elongatus*, *Cylicocyclus brevicapsulatus*, *Cylicostephanus longibursatus*, *Cylicostephanus bidentatus*, *Cylicostephanus minutus*, *Cylicostephanus calicatus*, *Cylicodontophorus bicoronatus*, *Poteriostomum ratzii* e *Gyalocephalus capitatus*). Neste estudo, *Strongylus vulgaris* e *Triodontophorus serratus* foram as espécies de estrongilíneos mais prevalentes, observadas em 100% dos animais parasitados, assim como todas as espécies de cistostomíneos, com exceção de *Cyathostomum montgomeryi* e *Cylicostephanus calicatus*, que apenas foram observadas em um e dois animais parasitados, respetivamente.

Os estudos realizados por Ibrahim *et al.* (2011) e Tesfu *et al.* (2014), revelaram ocorrências de infecções simples em 24,1% (47/195) e 54,1% (126/233) e infecções mistas em 74,4% (142/195) e 24,5% (57/233) dos asininos estudados. As infecções mistas com duas espécies de estrongilídeos ocorreram em 35,4% (69/195) e 24,5% (57/233) dos animais, com três espécies em 28,2% (55/195) e com quatro espécies em 10,8% (18/195) dos asininos. No estudo de Ibrahim *et al.* (2011), as espécies de estrongilíneos mais prevalentes foram *Strongylus vulgaris* (51,8%), *Strongylus edentatus* (30,8%), *Triodontophorus tenuicollis* (29,7%) e *Strongylus equinus* (12,3%). Tesfu *et al.* (2014) referem uma elevada intensidade de infecção, com 53,6% dos asininos severamente parasitados, 15,9% moderadamente e 8,6% suavemente parasitados. Os autores identificaram o sexo, a idade e a condição corporal como fatores de

risco para a infecção parasitária por estrongilídeos, observando diferentes prevalências de infecção entre fêmeas (78,6%) e machos (71,9%), elevada prevalência (82,3%) em animais com idade inferior a quatro anos e menor prevalência (66,9%) em animais com idade superior a dez anos, e maior prevalência de infecção (72,5%) em asininos com má condição corporal do que asininos com boa condição corporal (70,7%). Desta forma este estudo revelou maior intensidade de infecção por estrongilídeos em asininos do sexo feminino, com idade inferior a quatro anos e com má condição corporal.

Yilma *et al.* (1991) e Ayele *et al.* (2006), referem que *Strongylus vulgaris* foi a espécie predominante dos grandes estrongilídeos e o género *Cyathostomum* o mais frequente dos pequenos estrongilídeos.

Na Etiópia, um estudo realizado por Feseha *et al.* (1991), com 810 asininos, revelou uma ocorrência elevada (57,0%) de infecções maciças por estrongilídeos, com valores superiores a 2500 ovos por grama de fezes (OPG).

Mattioli *et al.* (1994), na Gambia, assim como Wells *et al.* (1998) e Matthee *et al.* (2004) na África do Sul, referem resultados similares aos dos trabalhos realizados na Etiópia, com frequências de infecção por estrongilídeos elevadas e superiores a 90,0%, assim como a ocorrência de infecções severas com valores superiores a 2000 OPG.

Na África do Sul, Matthee *et al.* (2002) observaram uma taxa de infecção por estrongilídeos de 95,5% (23/24), com 81,9% (19/23) de prevalência de infecção por ciatostomíneos e apenas 6,4% e 1,1% por *Strongylus edentatus* e *Strongylus vulgaris*, respetivamente.

O estudo de Atawalna *et al.* (2015), realizado no nordeste do Gana, revelou a ocorrência de infecção gastrointestinal por estrongilídeos em 26,9% (51/190) dos asininos analisados, com 6,7% de infecções simples e 20,2% de infecções mistas com coccídeos (Protozoa: Apicomplexa) do género *Eimeria*.

No Iraque, na província de Al Diwaniyah Governorate, Wannas *et al.* (2012), observaram 57,1% (32/56) de infecção por estrongilídeos em asininos adultos. Os autores referem a ocorrência de infecções simples em 28,6% (9/32) e infecções mistas em 71,4% (23/32) dos asininos.

No Irão, o estudo de Hosseini *et al.* (2009) revelou uma prevalência de infecções mistas por estrongilídeos em 100% dos 45 asininos observados. Os autores observaram estrongilíneos dos géneros *Strongylus* e *Triodontophorus*, com prevalências de infecção de 46,7% e 6,6%, respetivamente. A espécie *Strongylus vulgaris* foi observada em 33,3% dos asininos, enquanto *Strongylus equinus*, *Strongylus edentatus* e *Triodontophorus serratus* foram identificados em apenas 6,6% dos animais analisados. Os ciatostomíneos ocorreram em 100% dos asininos analisados, sendo observadas prevalências de 100%, 73,3%, 53,3% e 13,3% dos

gêneros *Cylicocyclus*, *Coronocyclus*, *Cyathostomum* e *Cylicostephanus*, respetivamente. Os autores referem prevalências de infeção das espécies *Cylicocyclus nassatus* (100%), *Coronocyclus labratus* (73,3%), *Cyathostomum tetracantum* (53,3%), *Cylicocyclus auricularis* (20,0%), *Cylicocyclus radiatus* (20,0%), *Coronocyclus coronatus* (13,3%), *Coronocyclus labiatus* (13,3%), *Cyathostomum alveolatum* (13,3%), *Cylicostephanus goldi* (6,6%) e *Cylicostephanus longibursatus* (6,6%).

Na Turquia, Uslu & Guçlu (2007, 2009) observaram uma prevalência de 100% (81/81) e de 96,8% (30/31) de infeção por estrongilídeos em asininos provenientes do distrito de Konya (Uslu & Guçlu, 2007) e das províncias da região central junto ao Mar Negro (Uslu & Guçlu, 2009).

Os gêneros de ciatostomíneos mais observados foram *Cyathostomum* (74,1%) e *Poteriostomum* (2,5%). Os estrogilíneos mais prevalentes foram *Strongylus vulgaris* (23,5%), *Strongylus edentatus* (14,8%) e *Triodontophorus* (4,9%). Os autores referem a ocorrência de 58,3% (43/81) de infeções simples e 46,9% (38/81) de infeções mistas, das quais 34,6% (28/81) infeções com duas espécies em simultâneo, 6,2% (5/81) com três espécies e 6,2% (5/81) com quatro espécies de estrongilídeos (Uslu & Guçlu, 2007).

Uslu & Guçlu (2009) referem uma prevalência de infeção por ciatostomíneos de 66,4% (20/30), observando os gêneros *Cyathostomum*, *Poteriostomum* e *Gyalocephalus* com prevalências de 63,8%, 1,7% e 0,9% respetivamente, e uma prevalência de infeção por estrongilíneos de 20,7% (6/30), com 8,6% de *Strongylus edentatus*, 6,0% de *Strongylus equinus*, 3,0% de *Strongylus vulgaris* e 3,0% do género *Triodontophorus*.

Papadopoulos *et al.* (2000), referem que a infeção parasitária de asininos por estrongilídeos é muito frequente na Grécia. Os autores observaram uma frequência de 37,0% para infeções por estrongilíneos e de 73,0% por ciatostomíneos.

Na Ucrânia, Kuzmina *et al.* (2007) e Kuzmina & Kuzmin (2008), referem que 100% dos asininos analisados estavam parasitados com estrongilídeos, sendo o nível médio de infeção parasitária de 75 OPG, com valores de 25 a 200 OPG. Na Alemanha são referidos valores semelhantes por Nielsen *et al.* (2006).

Os autores encontraram cinco gêneros e 17 espécies de estrongilídeos, 16 espécies de ciatostomíneos e uma espécie de estrogilíneo, em diferentes prevalências de infeção: *Cyathostomum tetracanthum* (100%), *Cylicocyclus nassatus* (88,5%), *Cyathostomum catinatum* (86,9%), *Cylicostephanus longibursatus* (81,2%), *Cylicostephanus goldi* (80,4%), *Cyathostomum pateratum* (21,2%), *Cylicocyclus auriculatus* (11,6%), *Coronocyclus coronatus* (9,6%), *Cylicocyclus ashworthi* (5,7%), *Strongylus edentatus* (5,7%), *Cylicostephanus calicatus* (5,7%), *Coronocyclus labiatus* (5,7%), *Cylicocyclus insigne*

(5,7%), *Cylicocyclus leptostomus* (3,8%), *Cylicostephanus minutus* (3,8%), *Cylicocyclus elongatus* (2,1%) e *Coronocyclus labratus* (2,1%) (Kuzmina & Kuzmin, 2008).

Cinco espécies de ciatostomíneos (*Cyathostomum tetracanthum*, *Cyathostomum catinatum*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus goldi* e *Cylicostephanus longibursatus*) dominaram a comunidade de estrongilídeos, correspondendo a 91,7% do número total de estrongilídeos recolhidos, e tendo sido encontradas em 80,0 a 100% dos asininos analisados Kuzmina & Kuzmin (2008).

Em todos os asininos analisados, foram observadas infecções mistas de duas a sete espécies em simultâneo no mesmo hospedeiro Kuzmina & Kuzmin (2008).

Kuzmina *et al.* (2006) refere um estudo realizado em seis asininos da reserva de Khersonska Oblast, Ucrânia. Os autores identificaram 23 espécies de estrongilídeos, três estrongilíneos e 20 ciatostomíneos. O número de espécies de ciatostomíneos por animal variou entre 11 e 14 e o número de espécies de estrongilíneos entre uma e duas. Foram observadas seis espécies dominantes (*Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus longibursatus*, *Cylicocyclus ashworthi*, *Cyathostomum catinatum*, *Cyathostomum pateratum*, *Coronocyclus labiatus*), encontradas em 100% dos asininos examinados e representando 78,5% da comunidade de estrongilídeos. Quatro espécies subdominantes (*Coronocyclus labratus*, *Cylicocyclus elongatus*, *Cylicostephanus minutus*, *Cyathostomum tetracanthum*) foram encontrados em mais de 66,0% dos animais que compõem 16,5% da comunidade. Treze espécies foram encontradas em 33,0% dos asininos correspondendo, sete das quais representavam 3,9% e seis espécies raras representavam apenas 1,1% do total da comunidade de estrongilídeos observados.

Na Índia, Shrikhande *et al.* (2009) e Chitra *et al.* (2011) observam 60,9% (50/82) e 76,1% (51/67) de prevalência de infecção por estrongilídeos em asininos.

Os autores registaram uma prevalência de infecção por estrongilíneos de 58,8% (47/82), observando os géneros *Strongylus* com 54,8% (45/82) e *Triodontophorus* com 2,4% (2/82), e apenas 15,9% (13/82) de prevalência de infecção por ciatostomíneos, observando apenas o género *Cyathostomum* (Shrikhande *et al.*, 2009).

Matto *et al.* (2015) referem que *Strongylus vulgaris* é a espécie de estrongilídeo mais prevalente, infetando 51,9% dos asininos da região de Mumbai e Pune.

Em São Luís, Estado do Maranhão, Brasil, Filho *et al.* (2013) e Ferreira *et al.* (2014), observaram prevalências de infecção por estrongilídeos de 68,0% (68/100) e de 100% (37/37), respetivamente.

Filho *et al.* (2013), referem que *Strongylus vulgaris* e *Strongylus edentatus* foram os mais prevalentes, com 42,0% (29/68) e 34,0% (23/68) de infecção, respetivamente. Neste estudo os autores observaram uma prevalência de infecção por ciatostomíneos de apenas 4,0% (3/68).

Ferreira *et al.* (2014) observaram uma variação de 0 a 6900 ovos por grama de fezes (OPG) referindo valores de $OPG \leq 500$ em 73,0% (27/37) dos animais analisados e de $OPG > 500$ em apenas 27,0% (10/37) dos asininos. No mesmo estudo, os autores observaram infecções mistas com diferentes associações parasitárias, de ciatostomíneos e strongilíneos, de acordo com a intensidade da infecção. Desta forma, a associação parasitária nos asininos com infecção fraca, com valores de $OPG \leq 500$, era composta por 65,0% Cyathostominae, 15,0% *Strongylus vulgaris* e 10,0% *Strongylus edentatus*, observando-se maior frequência para a associação Cyathostominae/*Strongylus vulgaris* do que nos asininos parasitados com valores de $OPG > 500$, onde foram observados 53,0% de Cyathostominae, 33,0% de *Strongylus vulgaris* e 13,0% de *Strongylus edentatus*.

Na costa leste do México, em Veracruz, existe uma importante população asinina utilizada no trabalho agrícola. Estudos referem uma prevalência de infecção por strongilídeos gastrointestinais superior a 90,0%, com contagens médias de ovos por grama de fezes próximas dos 400 OPG (Valdéz-Cruz *et al.*, 2013).

Reinemeyer (1986) e Lyons *et al.* (2007), referem que cerca de 95% dos ovos de strongilídeos, observados em exames coprológicos em equídeos dos Estados Unidos da América, são de ciatostomíneos.

O género *Strongylus* é o grande strongilídeo mais frequentemente observado em asininos (Jordan, 1986; Waqas *et al.*, 2015). Segundo Morris *et al.* (2004) e Khallaayoune, 1991, as espécies *Strongylus vulgaris*, *Strongylus equinus* e *Strongylus edentatus* são parasitas do intestino grosso mais comuns em asininos.

Segundo Wells *et al.* (1998), *Strongylus edentatus* é muito comum em asininos entre os seis meses e os três anos de idade e *Strongylus vulgaris* é frequente em animais idosos.

Jordan (1986), refere que o género *Strongylus* é o mais prevalente dos strongilíneos observados em asininos, sendo surpreendente a baixa incidência de cólicas por si provocadas nestes animais. O mesmo autor sugere uma grande estoicidade destes animais que, com sintomatologia menos evidente, tornam mais difícil o diagnóstico da maioria dos casos de cólicas.

Na Etiópia, Getachew *et al.* (2010) identificaram o género *Strongylus* em mais de 90,0% de amostras fecais provenientes de asininos e em 100% de asininos examinados *post-mortem*.

Pandey (1981), Khallaayoune (1991) e Borji *et al.* (2014), observaram larvas de *Strongylus vulgaris* em artérias mesentéricas de asininos necropsiados. Pandey (1981) e Khallaayoune (1991), identificaram larvas de *Strongylus vulgaris* em 90,5% e 87,0% de lesões arteriais observadas nas artérias mesentéricas de asininos necropsiados em Marrocos. Borji *et al.* (2014) refere a ocorrência de uma arterite parasitária, com obstrução completa da artéria

mesentérica cranial, devida à presença de larvas de *Strongylus vulgaris*. A cólica severa e fatal de um asinino macho com oito anos de idade, não sujeito a tratamento anti-helmíntico regular, ocorreu em Mashhad, no Irão.

Os estrongilídeos, em particular os pequenos estrongilídeos ou ciatostomíneos, são os parasitas mais importantes dos equídeos por estarem associados a situações de colite grave, diarreia crónica, mortalidade até 50% (Lyons *et al.*, 2000; Love, 2003).

As infeções por ciatostomíneos têm um impacto negativo na saúde dos asininos, reduzindo significativamente a sua condição corporal (Matthee, *et al.*, 2002b; Lind *et al.*, 2003; Peregrine *et al.*, 2006).

Krecek (2014a) refere estudos que revelam uma expansão da área de enquistamento dos ciatostomíneos, que parasitam desde a parede do intestino grosso à parede do intestino delgado de zebras. Pelo facto de, em condições naturais, as zebras suportarem cargas parasitárias superiores a 100 milhões de parasitas por animal, sem manifestarem sinais de patologia ou doença clínica, estes estudos sugerem que as modificações observadas sejam adaptações únicas que explicam a ausência de cólicas em zebras na natureza. A autora refere ainda que a área de enquistamento adicional será uma adaptação biológica que minimiza a competição entre os ciatostomíneos no interior do hospedeiro e que desta forma o hospedeiro continue a prosperar e a tolerar elevadas cargas parasitárias. Esta autora sugere também que adaptações similares ocorram nos ciatostomíneos parasitas de asininos.

Wells *et al.* (1998), referem que a contagem fecal de ovos é influenciada pela consistência das fezes e pelo total de fezes emitidas por dia. Nas fezes dos asininos, normalmente mais secas do que as fezes dos equinos, os ovos dos parasitas encontram-se mais concentrados, o que pode contribuir parcialmente para uma contagem de ovos elevada, frequentemente observada em asininos.

Embora a contagem fecal de ovos emitidos, por indivíduo, não esteja correlacionada com a severidade da infeção parasitária em causa, a média da contagem dos ovos emitidos pelos elementos de um rebanho permite calcular o ritmo de infeção, adquirida pelos equídeos, assim como o grau de contaminação do meio ambiente, com ovos dos parasitas (Uhlinger, 1991; Döpfer *et al.*, 2004).

Morriss *et al.* (2004) e Coles *et al.* (2006), referem a importância de se conhecer a população de parasitas dos asininos, assim como a sua distribuição na população hospedeira, para que se possa adoptar medidas terapêuticas adequadas de forma a evitar o aparecimento de resistências aos antiparasitários.

5.1.1. Estrongilidose asinina em Portugal

Em Portugal assiste-se a um interesse crescente pela criação de asininos, tendo em vista a sua conservação, em particular de algumas raças que se encontram em regressão. Atualmente é frequente observar a presença de asininos em explorações equestres. Estes equídeos devem ser incluídos nos programas de controlo parasitário, pois os seus parasitas são comuns aos cavalos (Madeira de Carvalho, 2006).

No entanto, no nosso país, são raros os estudos parasitológicos em asininos (Madeira de Carvalho, 2006), assim como em outros países mediterrânicos (Bliss *et al.*, 1985; Arsenos & Papadopoulos, 2006).

As patologias mais frequentes em asininos do sul da Europa estão relacionadas com deficiências nutricionais, mau maneio e com infeções parasitárias (Bliss *et al.*, 1985; Ram *et al.*, 2004; Pritchard *et al.*, 2005). Nestes países e segundo Bliss *et al.* (1985), as infeções parasitárias representam a principal causa de doença redutora do bem-estar dos asininos.

Segundo João Rodrigues e Miguel Quaresma (comunicação pessoal), médicos veterinários com experiência clínica em equídeos, em especial em asininos, em Portugal não existe a perceção clínica da importância das parasitoses intestinais em asininos. São animais mais resistentes e mais estoicos do que os cavalos, não manifestando facilmente sintomatologia.

Estudos realizados em animais da Raça Asinina de Miranda, no núcleo reprodutor de Vermiosa, revelaram 100% de prevalência de infeção por estrongilídeos intestinais. Em 12 animais, nove fêmeas adultas e três jovens, foi observada uma infeção constante com flutuações mensais ao longo do ano de 2005, apresentando uma curva anual de ovos por grama de fezes (OPG) com três picos, um pico durante o mês de abril (4000 OPG), outro no mês de julho (6095 OPG) e outro pico durante o mês de outubro (5897 OPG) (Gomes *et al.*, 2006, 2007).

Madeira de Carvalho (2001), refere um estudo de quatro anos em garranos bravios do Parque Natural da Peneda-Gerês (PNPG) onde observou uma elevada prevalência de infeção por estrongilídeos intestinais, com valores médios anuais entre 94,0 e 100%. A curva anual de OPG de estrongilídeos nestes animais é idêntica à referida por Gomes *et al.* (2006, 2007) nos asininos de Miranda. Segundo os valores médios mensais de OPG durante 1994/97, o autor observou quatro picos de eliminação de ovos de estrongilídeos na população de garranos bravios. Um pico em março (1617 OPG), em maio (2473 OPG), em junho (2774 OPG) e outro em outubro (2566 OPG).

Segundo Madeira de Carvalho (2001), os garranos bravios do PNPG apresentam níveis de infeção parasitária médios anuais elevados, cerca de 1865 OPG de estrongilídeos. Segundo o

mesmo autor, os valores de OPG dos animais bravios aumentam progressivamente do inverno até ao verão, onde atingem níveis mais elevados, e baixam significativamente até ao outono. De acordo com o autor, os garranos são animais que estão sempre em pastoreio, raramente são desparasitados e pela sua localização geográfica, poderão apresentar uma epidemiologia das parasitoses gastrintestinais, em particular da strongilidose, semelhantes aos dos asininos, podendo estes dados ser comparáveis e extrapoláveis para estes equídeos, cujo manejo e localização geográfica tem alguma sobreposição.

Segundo um estudo de prevalências de Gomes *et al.* (2007), os Cyathostominae foram prevalentes em relação aos Strongylinae observados em amostras fecais de animais da Raça Asinina de Miranda. Os autores verificaram a prevalência de 92,3% de *Cyathostomum sensu lato* seguida de *Trichostrongylus axei* (15,4%), *Triodontophorus* spp. (12,8%), *Gyalocephalus capitatus* (7,7%), *Poteriostomum* spp. (5,1%), *Strongylus vulgaris* (5,1%), *Strongylus equinus* (2,6%) e *Strongylus edentatus* (2,6%). Os autores observaram que antes e após desparasitação a população predominante foi de *Cyathostomum sensu lato*, sendo os mais frequentes *Cyathostomum* tipo A (96,4%) e tipo C (92,9%), com origem em espécies muito prevalentes e abundantes como *Cyathostomum catinatum*, *Cyathostomum nassatus* ou *Cyathostomum longibursatus*.

Segundo Madeira de Carvalho (2001), em Portugal existe uma elevada prevalência de ciatostomíneos, por vezes superior a 80,0% em equídeos estabulados. A prevalência dos strongilíneos têm vindo a aumentar, mas continua a ser menor do que a dos ciatostomíneos. A espécie *Strongylus vulgaris* apresenta uma prevalência anual global de 28,0%.

Madeira de Carvalho (2001), encontrou uma evidente predominância de ciatostomíneos em relação aos strongilíneos observados em garranos bravios do PNPG. *Cyathostomum sensu lato* foi o mais prevalente com 93,0%, seguido de *Poteriostomum* spp. (59,0%), *Oesophagodontus robustus* (39,0%), *Strongylus vulgaris* (15,0%), *Gyalocephalus capitatus* (15,0%), *Triodontophorus* spp. (6,0%), *Strongylus equinus* (6,0%), *Strongylus edentatus* (5,0%) e *Trichostrongylus axei* com apenas 0,3% de prevalência.

Madeira de Carvalho *et al.* (2007c), observou uma elevada prevalência de *Cyathostomum sensu lato* em asininos e híbridos estabulados, registando uma grande biodiversidade deste género em equídeos não desparasitados. *Cyathostomum* tipo A foi frequentemente observado, com 65,0 a 98,0% de abundância, seguido pelos morfotipos C e D, entre 6,0 a 8,0%, e os morfotipos B, E, F, G e H foram os menos frequentemente observados. Segundo os mesmos autores, as medidas de controlo antiparasitário diminuem a biodiversidade deste género.

Em Portugal os equídeos apresentam um parasitismo caracterizado por cargas parasitárias e biodiversidade elevadas e potencialmente muito patogénico (Madeira de Carvalho, 2006). O

autor refere que embora os anti-helmínticos tenham sofrido um grande desenvolvimento nos últimos 20 anos, não eliminaram os parasitas, particularmente os gastrointestinais. O conhecimento da população parasitária envolvida, assim como a conjugação da administração de anti-helmínticos com medidas de manejo, higiene e sanidade básicas, constituem a chave para um controlo integrado das parasitoses em equídeos.

5.1.2. Aspetos relacionados com a alteração climática global

Segundo Soulsby (1986) e Chapman *et al.*, (2001), a carga parasitária dos equídeos tende para uma incidência estacional, sendo reflexo da presença de larvas infetantes na pastagem. O crescente aumento do número de ovos eliminados desde o final da primavera até ao final do verão, traduz-se numa elevada concentração de larvas infetantes nas pastagens durante os meses de setembro e outubro. Nos restantes meses do ano, devido à diminuição da eliminação de ovos e às condições desfavoráveis ao desenvolvimento das fases larvares livres, ocorre um acentuado decréscimo do número de larvas na pastagem. As larvas infetantes do final do verão originam populações de parasitas adultos na primavera seguinte. Parece haver um ciclo anual nas populações de parasitas adultos, desenvolvendo-se novos adultos a partir de larvas que passam o inverno quiescentes na parede intestinal do hospedeiro. Embora as larvas infetantes possam sobreviver durante o inverno na pastagem, não constituem uma fonte importante de infeção para os equídeos na primavera seguinte.

O clima influencia o desenvolvimento e sobrevivência dos estádios de vida livre dos estrongilídeos parasitas gastrintestinais. A temperatura e a humidade ambientais são fatores climáticos que determinam a quantidade de larvas infetantes na pastagem, durante as diferentes épocas do ano, assim com a sua viabilidade ou capacidade infetante (Holland *et al.*, 2001; Langrová *et al.*, 2003; Bezerra *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007). Desta forma as alterações climáticas podem exercer um impacto profundo no desenvolvimento e sobrevivência dos parasitas, assim como na dinâmica de transmissão e relação parasita-hospedeiro (Altizer *et al.*, 2013; Molnár *et al.*, 2013).

No entanto as alterações climáticas podem exercer um impacto profundo no desenvolvimento e sobrevivência dos parasitas, assim como na sua dinâmica de transmissão (Altizer *et al.*, 2013; Molnár *et al.*, 2013).

A dinâmica da transmissão das helmintoses é complexa, envolvendo interação entre fatores ambientais regionais, com fatores específicos do hospedeiro e fatores específicos dos parasitas em infeções multi-espécies concorrentes (Morgan *et al.*, 2013). Considerando a influência das

alterações climáticas em todas estas interações, a complexidade da mudança climática excede a capacidade dos modelos atuais para prever os impactos futuros (Bellard *et al.*, 2012; Pickles *et al.*, 2013), no entanto as mudanças ambientais rápidas induzem respostas evolutivas igualmente rápidas (Kutz *et al.*, 2014; Mateos-Gonzalez *et al.*, 2015). Apenas será possível gerar previsões úteis sobre o impacto das mudanças climáticas se houver um profundo conhecimento dos fatores de mudança climática assim como da biologia, ecologia e distribuição do hospedeiro e parasita e dinâmica parasita-hospedeiro (Rose *et al.*, 2014).

As atuais alterações climáticas parecem favorecer o desenvolvimento dos nematodes nas regiões temperadas. O aquecimento previsto irá favorecer a contaminação da pastagem e o desenvolvimento dos estádios infetantes de parasitas, esperando-se um aumento da frequência e da intensidade de parasitoses gastrointestinais assim como de alterações dos padrões sazonais (Pereira da Fonseca & Madeira de Carvalho, 2008).

As alterações climáticas atuam de forma a modificar o período de maior risco de infeção ou pico de infeção e consequentemente a altura de transmissão do parasita. Desta forma influencia não só a sazonalidade de infeção como também a imunidade do hospedeiro (Gauly *et al.*, 2013).

Se essas tendências se confirmarem, os europeus podem ser confrontados com desafios parasitológicos novos e desconhecidos. Os autores consideram que são necessários estudos sobre os efeitos das alterações climáticas que ajudem a compreender o seu impacto e que permitam orientar estratégias de prevenção e tratamento das parasitoses (Rocque *et al.*, 2008; Morgan & Wall, 2009) assim como do aparecimento das resistências anti-helmínticas (Morgan & Wall, 2009).

O aumento da frequência de infeção parasitária e a consequente administração de anti-helmínticos será uma prática insustentável levando ao rápido desenvolvimento de resistências. Pelo que serão necessárias novas abordagens de forma a ser possível um controlo parasitário sustentável (Gauly *et al.*, 2013).

As regiões temperadas poderão sofrer profundas alterações dos seus ecossistemas. O aumento da temperatura média e da pluviosidade tornará o inverno mais quente e húmido, aproximando as estações do ano e tornando o clima mais ameno, semelhante ao clima das regiões subtropicais e tropicais (IPCC, 2014).

É possível que na Europa se observe um deslocamento das condições climáticas potencialmente mais produtivas para norte, com os países nórdicos europeus apresentarem melhores produções agrícolas devido ao aumento da temperatura e da precipitação média. Muitos países do sul da Europa, incluindo Portugal, sofreram quebras de rendimento até 30,0% (Iglesias *et al.*, 2007; CONFAGRI, 2009).

Portugal poderá estar sujeito a alterações climáticas causadoras de stress térmico e hídrico, esperando-se um aumento da temperatura ao longo do ano e uma diminuição da precipitação (CONFAGRI, 2009).

Tradicionalmente em climas temperados frios a quantidade de larvas infetantes na pastagem é menor durante os meses de inverno, e em climas quentes durante o verão (Kuzmina *et al.*, 2006; Bezerra *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007). A manutenção das temperaturas e humidades ótimas para o desenvolvimento larvar, por períodos mais longos, permite a sobrevivência dos estádios infetantes até mais tarde, aumentando a sua disponibilidade no meio ambiente (Pereira da Fonseca & Madeira de Carvalho, 2008).

Invernos suaves e molhados com poucos dias de congelamento favorecem a sobrevivência das L3 na pastagem até a primavera seguinte. Verões menos quentes e mais húmidos permitem uma maior sobrevivência e permanência das larvas infetantes na pastagem até ao outono seguinte (Nielsen *et al.*, 2007). Desta forma as L3 mantêm-se na pastagem ao longo do ano e de um ano para o outro (Langrová *et al.*, 2003; Ramsey *et al.*, 2004; Kuzmina *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2007).

No nosso país, tem-se evidenciado um elevado nível de contaminação das pastagens dos equídeos durante todo o ano, incluindo no inverno e verão, estações do ano em que tradicionalmente as pastagens apresentavam níveis de contaminação muito baixos (Pereira da Fonseca & Madeira de Carvalho, 2008). Por outro lado, as elevadas contagens de ovos por grama de fezes (OPG) são observadas ao longo de todo o ano (Madeira de Carvalho, 2001; 2006; Madeira de Carvalho *et al.*, 2007).

No contexto das atuais alterações climáticas a duração do ciclo biológico tende a ser menor. O clima ameno diminui o período de desenvolvimento dos estádios exógenos, assim como diminui o período de desenvolvimento retardado nas formas de hipobiose. Desta forma o tempo de geração tende a diminuir, aumentando a frequência de gerações parasitárias (Pereira da Fonseca & Madeira de Carvalho, 2008).

O conhecimento das influências climáticas sobre o desenvolvimento e sobrevivência das fases de vida livre é fundamental para a atualização dos perfis epidemiológicos assim como para o planeamento de sistemas de controlo parasitário estratégico mais adequado aos novos padrões climáticos (Nielsen *et al.*, 2007; Pereira da Fonseca & Madeira de Carvalho, 2008).

6. CONTROLO DA ESTRONGILIDOSE EM ASININOS

6.1. Estratégias de controlo

Um dos maiores desafios colocados ao controlo da estrongilidose asinina é a avaliação clínica, sendo raro manifestarem sinais clínicos como diarreia, perda de peso, má condição corporal ou cólicas, que são mais comuns em equinos. A infeção por estrongilídeos como causa de doença, morbilidade e mortalidade em asininos é ainda indeterminada, no entanto a informação atualmente disponível sobre estrongilidose equina sugere uma extrapolação de dados para uma apreciação global dos equídeos (Matthews & Burden, 2013).

Nos últimos 50 anos, o controlo da estrongilidose em equídeos tem-se centrado no uso regular de anti-helmínticos sintéticos, em particular nos países desenvolvidos do mundo ocidental (Kaplan & Nielsen, 2010; Francisco *et al.*, 2011; Von Samson-Himmelstjerna, 2012).

Numa perspetiva histórica, o controlo da estrongilidose dos equídeos tem sido caracterizada por estratégias direcionadas a algumas espécies de particular importância patogénica. Na década de 1960 os programas de controlo orientaram-se para os grandes estrongilídeos, em particular para *Strongylus vulgaris*, considerado o principal agente patogénico dos equinos (Love & Duncan, 1991). O princípio dose/intervalo e o conceito de protocolo de desparasitação para prevenir a transmissão de estrongilídeos (Drudge & Lyons, 1966) foi amplamente adotado e eficaz, uma vez que durante os anos 1970 a 1990, a prevalência de *Strongylus vulgaris* tornou-se praticamente inexistente (Brady & Nichols, 2009; Reinemeyer & Nielsen, 2009; Nielsen *et al.*, 2012a,b). Apesar da redução da prevalência de infeção por *Strongylus vulgaris*, o uso generalizado de tratamentos estratégicos, com administração frequente e regular de anti-helmínticos, prevaleceu até aos nossos dias (Earle *et al.*, 2002; Relf *et al.*, 2012). Durante este período surgiram evidências clínicas graves de ciatostominose larvar e tornou-se consensual a importância patogénica dos ciatostomíneos, até então considerados parasitas relativamente benignos (Love & Duncan, 1991).

Poucos anos após o início do uso de compostos sintéticos na desparasitação de equídeos, foi observada a primeira resistência anti-helmíntica em ciatostomíneos e desde então têm surgido resistências a todos os grupos de compostos sintéticos disponíveis (Trawford & Burden, 2012). Nielsen (2012) considera que as tendências, do controlo parasitário de equídeos, parecem mudar constantemente e que o foco atual não é uma espécie em particular de parasita gastrointestinal, mas sim a resistência a anti-helmínticos em geral. O mesmo autor observa que a atual ênfase em diminuir a pressão de seleção poderá conduzir a outros desafios no futuro próximo.

6.2. Mudança de paradigma

As últimas décadas foram caracterizadas por um intenso controlo da estrongilidose dos equídeos (Kaplan & Nielsen, 2010; Von Samson-Himmelstjerna, 2012) através de tratamentos anti-helmínticos preventivos, regulares e frequentes, claramente destinados a manter os equídeos livres de parasitas (Love, 2003). Contudo, não foi erradicada uma única espécie de parasita de equídeo, observando-se apenas uma flutuação da biodiversidade na população de helmintes com a alteração da prevalência e intensidade de infeção de espécies particulares (Nielsen, 2012). Infelizmente, esta situação levou ao aumento dos níveis de resistência, agora presente em muitas espécies de nematodes e em praticamente todos os grupos de anti-helmínticos disponíveis (Canever *et al.*, 2013; Lester *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2013b, 2014; Relf *et al.*, 2014).

Atualmente é aceite, pela comunidade científica, que a abordagem tradicional de controlo anti-helmíntico estratégico, baseada em tratamentos frequentes, de grupo, com administrações de anti-helmínticos em intervalos regulares, contribuiu para o desenvolvimento de resistências (Lloyd *et al.*, 2000; Kaplan, 2002, 2004; Nielsen, 2009).

Segundo Schneider *et al.* (2014), os animais parasitados, e eliminadores de um elevado número de ovos, passam despercebidos ao controlo estratégico e não são tratados em tempo útil, aumentando a contaminação ambiental e consequentemente o risco de infeção e reinfeção de outros animais.

Por conseguinte, é necessária uma mudança de estratégia no controlo parasitário dos equídeos (Nielsen, 2012).

A mudança de paradigma do controlo parasitário envolve alterações profundas de conceitos. As estratégias destinadas a manter os equídeos livres de parasitas, com infeção e transmissão nulas, dão lugar a novas estratégias baseadas na vigilância do parasitismo com criteriosa seleção de tratamentos anti-helmínticos específicos (Eysker *et al.*, 2006; Van Wyk *et al.*, 2006; Becher *et al.*, 2010; Nielsen, 2012; Menzel, 2013).

Aceitar que o parasitismo é um estado normal e natural para os hospedeiros, e que por ter ocorrido uma coevolução ao longo de milhões de anos os parasitas intestinais são parte da fauna normal dos organismos que habitam o intestino dos hospedeiros (Catalano *et al.*, 2014; Haywar, *et al.*, 2014), é mudar o paradigma do controlo parasitário (Nielsen, 2012).

O objetivo deixa de ser eliminar os parasitas e passa a ser manter níveis baixos de parasitismo que não causem doença ou perda de desempenho dos equídeos. Por outro lado, os anti-helmínticos passam a ser usados de maneira a retardar o desenvolvimento de resistências, preservando assim a eficácia dos compostos sintéticos existentes (Nielsen, 2012).

Nielsen (2012) considera que o atual controlo parasitário baseia-se num princípio simples mas de concretização complexa. Segundo o autor o atual desafio do controlo parasitário consiste em elaborar uma estratégia holística considerando que os equídeos são hospedeiros de uma fauna parasitária complexa, composta por muitas espécies diferentes igualmente relevantes, tanto do ponto de vista patogénico, como do potencial para adquirirem resistências.

As atuais estratégias de controlo parasitário têm o objetivo de tratar apenas o suficiente, evitando tratamentos desnecessários ou ineficazes (Nielsen, 2012; Matthews, 2014) e o grande desafio consiste em saber veicular esta mensagem aos proprietários de equídeos, para que haja aceitação e a adesão necessária à sua concretização (Nielsen, 2012; Lester *et al.*, 2013; Relf *et al.*, 2013; Stratford *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2014).

6.2.1. Controlo seletivo

Com o objetivo de resolver o problema da resistência anti-helmíntica emergente, em particular dos ciatostomíneos, foi considerada uma nova abordagem de controlo antiparasitário em equídeos (Becher *et al.*, 2010; Nielsen, 2012; Menzel, 2013). Com base na experiência adquirida nas estratégias de tratamento em ruminantes (Kenyon *et al.*, 2010) foi proposto o controlo seletivo do parasitismo gastrointestinal em equídeos considerando o valor da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (Gomez & Georgi, 1991; Krecek *et al.*, 1994; Becher *et al.*, 2010; Nielsen, 2012; Francisco *et al.*, 2012).

Nielsen *et al.* (2010a), referem um estudo realizado na Universidade de Kentucky, em 693 cavalos com idades inferiores a dois anos, ao longo de 50 anos, que relaciona os resultados de contagens fecais de ovos e de culturas de larvas com o número de nematodes observados. O número de ovos e larvas não teve correlação linear direta com a carga parasitária observada nos cavalos, no entanto os valores da contagem fecal de ovos de strongilídeos abaixo de 500 ovos por grama de fezes (OPG) corresponderam a uma contagem significativamente baixa de nematodes adultos, e valores acima de 500 OPG corresponderam a contagens substancialmente altas de nematodes adultos. Estes dados justificaram a decisão de não tratar animais com valores entre 0 e 500 OPG e de tratar os animais com valores superiores a 500 OPG. Embora este estudo evidencie o valor limiar de 500 OPG, este resultado deve ser interpretado com cautela ao ser aplicado em populações diferentes da que lhe deu origem.

De uma forma geral, o limiar de tratamento mais utilizado e aceite internacionalmente é 200 OPG, acima do qual é recomendado o tratamento do equídeo com anti-helmínticos (Krecek *et*

al., 1994; Bowman *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2006a; Becher *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2012a,b; Relf *et al.*, 2013).

Trawford & Burden (2012), referem que o limiar de tratamento de 1000 OPG mostrou-se eficaz no controlo seletivo de asininos adultos. Os autores referem que este limiar de tratamento permitiu reduzir o número médio de tratamentos anti-helmínticos de quatro para uma vez por ano. No entanto, Lopes *et al.* (2015) e Melo-Franco *et al.* (2015) referem que deverá ser ponderada a utilização do limiar de 500 OPG para o controlo parasitário, em equinos e asininos, em Portugal.

Independentemente da espécie hospedeira, o parasitismo dispersa-se entre os indivíduos de um rebanho (Relf *et al.*, 2013; Wood *et al.*, 2013). Molnar & Kassai (1994) e Nielsen *et al.* (2006b), referem que apenas 20% dos equídeos acolhem 80% da população de estrongilídeos. Estudos recentes demonstram que a percentagem real de equídeos, responsável pela excreção de 80% da carga parasitária no ambiente é inferior a 20% da população (Lester *et al.*, 2013; Relf *et al.*, 2013).

O controlo seletivo permite identificar os animais eliminadores de elevada carga parasitária para o meio ambiente, que concentram os parasitas, e trata-los de forma seletiva, reduzindo o número de tratamentos com anti-helmínticos (Nielsen *et al.*, 2006a; Becher *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2014a).

Trawford & Burden (2012), referem que a monitorização frequentemente de asininos, realizada em quatro semanas ao longo do ano, permite programas de tratamento individualizado e reduzir a contaminação da pastagem.

Deste modo, os nematodes parasitas dos equídeos não tratados podem atuar como uma fonte de refúgio relativamente à pressão seletiva exercida pelos fármacos antiparasitários (Van Wyk, 2001; Bowman *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2006a; Van Wyk, 2006; Kenyon *et al.*, 2009).

Supõe-se que o pequeno número de nematodes resistentes sobreviventes ao tratamento dos equídeos possam ser rapidamente diluídos pelos parasitas em refúgio, levando a uma acumulação lenta na população de alelos genéticos que codificam para a resistência aos anti-helmínticos. Atualmente não existem estudos quantitativos que fundamentem esses princípios, no entanto, a monitorização da excreção de ovos e a redução de tratamentos anti-helmínticos ao longo do tempo são a base dos programas de controlo mais responsáveis (Madeira de Carvalho *et al.*, 2014; Matthews *et al.*, 2014). Todas as fases de desenvolvimento parasitário, não expostas ao anti-helmíntico na altura do tratamento, estão em refúgio por não estarem sujeitas à pressão de seleção. Sendo considerados todos os estádios de desenvolvimento exógenos de estrongilídeos (ovos, L1, L2 e L3) e larvas de ciatostomíneos

enquistadas na mucosa intestinal de equídeos tratados com anti-helmínticos sem atividade larvicida (Nielsen *et al.*, 2006a).

Atualmente o conceito de refúgio é amplamente aceite e assume-se que desempenha um papel central e muito importante na prevenção do desenvolvimento de resistência anti-helmíntica, no entanto até ao momento não existem estudos quantitativos que fundamentem esses princípios (Eysker *et al.*, 2006; Van Wyk *et al.*, 2006; Matthews *et al.*, 2014).

A adesão ao controlo seletivo, com programas de tratamento dirigidos a equídeos eliminadores de elevada carga parasitária para o meio ambiente, tem sido muito variável entre regiões, países e entre os diferentes sistemas de produção (Relf *et al.*, 2013; Robert *et al.*, 2014). No entanto, Lester *et al.* (2013) e Krecek *et al.* (2014), referem que sempre que seja adotado o controlo seletivo, ocorre uma redução efetiva do uso de anti-helmínticos, pelo que existe um incentivo económico importante para o proprietário/criador.

Apesar das recomendações constantes de mudança para o controlo seletivo, aconselhadas pelos parasitologistas durante as últimas décadas, os hábitos dos proprietários de equídeos permaneceram fieis aos princípios dose/intervalo do controlo estratégico. Inquéritos revelaram que, durante a década de 1990, no Reino Unido observou-se uma tendência geral de seis tratamentos anuais (Earle *et al.*, 2002), na Irlanda os equídeos foram tratados em intervalos de quatro a seis semanas durante todo o ano (O'Meara & Mulcahy, 2002) e em África do Sul os equídeos foram tratados anualmente entre cinco e sete vezes (Matthee *et al.*, 2002).

Na Europa, atualmente o controlo seletivo tem sido amplamente utilizado com sucesso em vários países como Alemanha, Dinamarca, Finlândia, Inglaterra, Holanda e Suécia (Duncan & Love, 1991; Becher *et al.*, 2010; Nielsen, 2012; Nielsen *et al.*, 2012; Greite, 2013; Nielsen *et al.*, 2014c), tendo sido também usado em Portugal (Madeira de Carvalho *et al.*, 2014) e em Espanha (Francisco *et al.*, 2012).

Vários estudos documentam a utilização de controlo seletivo em África do Sul (Krecek *et al.*, 1994; Krecek & Guthrie, 1999; Matthee *et al.*, 2002b).

Nos Estados Unidos da América, muitos proprietários de equídeos estão dispostos a mudar para o controlo seletivo se houver evidência significativa da redução da ocorrência de resistências a anti-helmínticos assim como dos riscos de saúde para os animais (Robert *et al.*, 2014).

Os proprietários de pequenas explorações, de animais utilizados em atividades de lazer, têm aderido mais facilmente à gestão de controlo seletivo do que as grandes coudelarias, proprietárias de animais selecionados e diferenciados (Lester *et al.*, 2013; Relf *et al.*, 2013; Stratford *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2014).

Nielsen *et al.* (2006), Becher *et al.* (2010), Nielsen *et al.* (2012c,d), Pilo *et al.* (2012), Studzińska *et al.* (2012) e Hertzberg *et al.* (2014) observaram um aumento da prevalência de infecção por *Strongylus vulgaris* em explorações onde se reduziu a intensidade de tratamento anti-helmíntico ao longo de vários anos, pelo que os autores consideram que o controlo seletivo poderá aumentar a probabilidade de *Strongylus vulgaris* completar seu ciclo biológico e potenciar o seu reaparecimento. Hertzberg *et al.* (2014) e Matthews (2014), consideram que são necessários mais estudos para avaliar esta possibilidade.

Métodos diagnósticos utilizados

As técnicas coprológicas quantitativas de diagnóstico parasitológico, atualmente utilizadas no controlo seletivo, são simples e baratas permitindo uma abordagem de tratamento mais objetiva com a utilização de anti-helmínticos de espectro de ação específico, e evitando desparasitações desnecessárias com anti-helmínticos de espectros de ação amplos (Madeira de Carvalho, 2006).

As análises coprológicas quantitativas, com contagem de ovos fecais, são fundamentais para o controlo seletivo, no entanto não permitem fazer o diagnóstico de género ou espécie. Por existirem cerca de 60 espécies de estrongilídeos parasitas de equídeos domésticos com diferentes potenciais patogénicos, a contagem de ovos pode não ser suficiente para interpretar a gravidade da infecção. Por outro lado, quando é necessário um elevado número de análises, estas podem tornar-se dispendiosas para o proprietário, muitas vezes mais caras do que o anti-helmíntico (Nielsen, 2012).

A cultura de ovos para obtenção de larvas pode ser realizada, no entanto o método é demorado, trabalhoso e requer um nível de competência técnica elevado para a leitura das amostras (Nielsen, 2012).

As análises coprológicas também não permitem diagnosticar a fase pré-patente da infecção (Matthews, 2008). Devido ao longo período pré-patente, das várias espécies de estrongilídeos, e à ocorrência de doença grave causada pelas fases larvares, há necessidade de utilizar métodos de diagnóstico que permitam detetar e quantificar os níveis de infecção por estádios imaturos destes parasitas (Matthews, 2014). Atualmente, alguns estudos procuram dar resposta à necessidade de diagnóstico precoce da estrongilose larvar avaliando a potencial utilidade de alguns antigénios funcionarem como marcadores para o diagnóstico da fase pré-patente da infecção por ciatostomíneos (McWilliam *et al.*, 2010) e por *Strongylus vulgaris* (Andersen *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2014d). Alguns testes ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) têm sido desenvolvidos com base na medição dos níveis de IgG sérica

específica para dois antígenos, presentes em larvas de terceiro e quarto estágio de desenvolvimento de ciatostomíneos (Dowdall *et al.*, 2002, 2004; McWilliam *et al.*, 2010). Com este objetivo, também têm sido purificados antígenos de excreção/secreção de ciatostomíneos pela técnica de cromatografia líquida FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) que tem mostrado bons resultados no diagnóstico de infecção assim como na avaliação de tratamentos anti-helmínticos (Paz-Silva *et al.*, 2011b).

Testes de *Immunoblotting* e de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* mostram que o antígeno SvSXP de *Strongylus vulgaris* poderá ser utilizado como marcador de diagnóstico da infecção (Andersen *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2014d). Entretanto, na ausência de testes de diagnóstico eficazes, recomenda-se que os tratamentos seletivos, dirigidos aos equídeos eliminadores de ovos, devem ser equilibrados e equacionados com os tratamentos estratégicos com administração de anti-helmínticos larvicidas, dirigidos aos estádios larvares indetetáveis por análise coprológica (Matthews, 2008; Hertzberg *et al.*, 2014).

6.2.2. Controle integrado e sustentável

Apesar da mudança gradual do controle parasitário de estratégico para seletivo, atualmente a prevalência de resistência a anti-helmínticos é muito elevada, com evidência de resistências em todas as classes de anti-helmínticos disponíveis para uso em equídeos (Lyons *et al.*, 1999; Molento *et al.*, 2008; Trawford & Burden, 2012), pelo que existe uma forte motivação para desenvolver estratégias de controle integrado e sustentável que não dependam exclusivamente da utilização de anti-helmínticos sintéticos (Herd, 1998; Hinney *et al.*, 2001; Krecek & Waller, 2006).

Fatores como a resistência a anti-helmínticos, a resiliência individual do animal às infecções parasitárias e a consciência ambiental, continuarão a justificar a mudança da gestão do controle parasitário. Juntamente com o tratamento, outros métodos de controle têm sido utilizados para diminuir a dependência em relação à utilização de anti-helmínticos (Krecek, 2014a). Algumas destas intervenções incluem práticas que visam quebrar o ciclo de transmissão dos parasitas, prevenindo ou reduzindo a reinfeção dos animais através da pastagem. Métodos como a redução da contaminação da pastagem por remoção de fezes, gestão da pastagem com rotação e pousio do pastoreio, assim como o controle biológico e a nutrição estratégica, têm sido descritos por vários autores (Herd, 1998; Waller, 1999; Hinney *et al.*, 2001; Paraud *et al.*, 2005; Krecek & Waller, 2006; Francisco *et al.*, 2012; Krecek, 2014a).

Matthee *et al.*, (2002) e Nielsen (2012), referem que antes de surgirem os anti-helmínticos seguros e eficazes, o manejo da pastagem dirigido aos estádios de vida livre dos parasitas manteve-se como a única opção para o controlo da carga parasitária nos equídeos. No entanto, o aparecimento de resistências aos anti-helmínticos permitiu uma nova abordagem a esse conhecimento.

Herd (1986) demonstrou que a remoção de fezes da pastagem duas vezes por semana foi mais eficaz do que a terapia anti-helmíntica na redução dos níveis de larvas de estrongilídeos na pastagem. Mais recentemente, o estudo de Corbett *et al.* (2014) concluiu que a limpeza da pastagem, com remoção fecal duas vezes por semana, consiste num método de controlo útil que permite reduzir significativamente a transmissão de estrongilídeos. Esses estudos confirmaram que a remoção de fezes da pastagem duas vezes por semana reduz significativamente o número de ovos de estrongilídeos eliminados pelas fezes de asininos em pastoreio comum, verificando-se assim que essa prática é uma ferramenta de gestão útil para reduzir o uso de anti-helmínticos, diminuindo assim a pressão de seleção e consequentemente a resistência contra estes anti-helmínticos.

É recomendada a remoção de fezes em intervalos frequentes de forma a evitar o desenvolvimento de larvas infetantes, do terceiro estágio de desenvolvimento (Ramsey *et al.*, 2004), visto que as larvas infetantes (L3) migram das fezes dispersando-se para a pastagem (Matthee *et al.*, 2002b). Em climas temperados quentes a remoção de fezes da pastagem duas vezes por semanas é eficaz, mas o desenvolvimento exógeno dos parasitas é mais rápido nas regiões tropicais e subtropicais (Ramsey *et al.*, 2004), onde as larvas infetantes de ciatostomíneos podem desenvolver-se em menos de quatro dias (Nielsen *et al.*, 2007).

O manejo da pastagem é particularmente importante na gestão do controlo parasitário em asininos. Como os asininos têm necessidades nutricionais diferentes dos restantes equídeos, em climas temperados tende-se a restringir o acesso à pastagem aumentando a densidade animal por área de pastagem, sendo prática comum utilizar 0,1 a 0,2 de hectare por animal (Matthews & Burden, 2013). Como a prevalência e a intensidade do parasitismo estão diretamente relacionadas com a densidade dos hospedeiros (Patterson & Ruckstuhl, 2013), e o encabeçamento é crítico para o controlo do parasitismo em equídeos (Madeira de Carvalho, 2001; Hutching *et al.*, 2003), tais densidades podem significar uma contaminação elevada da pastagem (Matthews & Burden, 2013). Embora os asininos sejam animais herbívoros seletivos, quando fechados em pequenas áreas, alteram o seu comportamento natural e passam a alimentar-se junto ou dentro das áreas de defecação, aumentando o risco de infeção parasitária. Nestas condições os asininos podem acumular um grande número de estrongilídeos, que comprometem seriamente a sua saúde (Kuzmina, 2012; Matthews &

Burden, 2013; Relf *et al.*, 2013; Matthews, 2008, 2014) sendo fundamental um manejo eficaz da pastagem com remoção de fezes, duas vezes por semana (Patterson & Ruckstuhl, 2013).

Hébert *et al.* (2010) referem que a gestão do estrume é importante para não haver contaminação da pastagem. A compostagem deverá atingir a temperatura mínima de 50 a 70°C durante oito horas e mantida durante um período mínimo de três semanas para assegurar a destruição dos ovos de helmintes.

Estudos na Austrália (Hutchinson *et al.*, 1989) e no Texas, Estados Unidos da América (Houston *et al.*, 1984), avaliaram o papel de escaravelhos da família *Scarabaeidae* na sobrevivência dos estádios de vida livre de parasitas. Atualmente, os resíduos fecais de alguns anti-helmínticos podem interferir com estes estudos provocando a morte dos escaravelhos (Edward & Hoffmann, 2007). Por conseguinte, esta questão deve ser tida em conta aquando da implementação de uma abordagem integrada que vise explorar a atividade dos escaravelhos e o uso de lactonas macrocíclicas (Nielsen, 2012).

O estado vegetativo e biodiversidade florística da pastagem permitem a existência de condições ambientais, como humidade e temperatura, favoráveis ao desenvolvimento assim como de permanência e viabilidade dos estádios exógenos de estrongilídeos (Ronchi & Nardone, 2003). Lyons *et al.* (2000) referem que a lavoura das pastagens durante os períodos de maior calor expõe as larvas à dessecação contribuindo para uma diminuição da população das formas infetantes de estrongilídeos.

Os ovinos e bovinos podem agir como aspiradores biológicos de parasitas de asininos, pelo que a alternância da pastagem com ruminantes pode diminuir os níveis de contaminação ambiental de parasitas (Matthews & Burden, 2013; Matthews, 2014). Kuzmina *et al.* (2006), referem que na Ucrânia foi necessário utilizar ruminantes durante um período mínimo de seis meses para que houvesse uma redução efetiva da população de estrongilídeos na pastagem utilizada por asininos.

O controlo biológico com fungos nematófagos consiste numa medida eficaz no controlo da contaminação ambiental por parasitas (Gortari *et al.*, 2006; Madeira de Carvalho *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2012; Madeira de Carvalho *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2013a), que pode ser associada de forma sinérgica ao controlo com recurso a anti-helmínticos de síntese (Braga *et al.*, 2009; Arias *et al.*, 2013b). Os fungos nematófagos são organismos inócuos para animais e plantas que podem atuar como agentes ovicidas, predadores e endoparasitas. O género *Mucor* tem a capacidade de quebrar a parede de ovos de helmintes, pelo que é ovicida e frequentemente testado no controlo ambiental de ovos de helmintes (Gortari *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2013a; Hernández *et al.*, 2015).

Os géneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* apresentam atividade predadora, podendo capturar e destruir larvas infetantes de nematodes parasitas (Araujo *et al.*, 2010; Paz-Silva *et al.*, 2011; Assis *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2012). *Duddingtonia flagrans* é um fungo saprófita frequentemente encontrado em solos naturais e agrícolas, que pode tornar-se predador na presença de larvas de nematodes (Scholler *et al.*, 1999). Este fungo caracteriza-se pela produção de clamidospórios de paredes espessas que transitam pelo trato gastrointestinal de herbívoros e são eliminadas intactos nas fezes, estabelecendo-se no ambiente com o desenvolvimento de um sistema extensivo de hifas que capturam larvas de nematodes para obter nutrientes (Fernández *et al.*, 1999). Pelas suas características as espécies *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* têm sido usadas, um pouco por todo o mundo, no controlo de larvas infetantes de ciatostomíneos nas pastagens (Madeira de Carvalho *et al.*, 2007; Braga *et al.*, 2011; Madeira de Carvalho *et al.*, 2011; Paz-Silva *et al.*, 2011a; Tavela *et al.*, 2011; Madeira de Carvalho *et al.*, 2012). Araujo *et al.* (2012), e estes autores referem a necessidade de se realizar estudos de campo com o objetivo de observar a eficiência de fungos nematófagos no controle ambiental de estrongilídeos parasitas de asininos, de forma a contribuir para uma abordagem integrada do controlo da estrongilose asinina.

A nutrição estratégica baseia-se no conceito de que a alimentação é capaz de modular a capacidade do hospedeiro resistir às infeções. Kyriazakis & Houdijk (2006), referem que a nutrição melhorada em proteínas aumenta a resiliência dos ovinos, melhorando a sua capacidade de resistir à infeção parasitária gastrointestinal, e que aumenta também a resistência ao parasitismo, melhorando a resposta imunitária dos ovinos de forma a limitar o desenvolvimento da população de parasitas gastrointestinais. Por outro lado a desnutrição pode diminuir a capacidade de resiliência e resistência às infeções, aumentando o risco de parasitose grave (Getachew *et al.*, 2010). Kyriazakis & Houdijk (2006) consideram que a imunonutrição pode ser importante para uma estratégia de controlo parasitário eficaz.

As pastagens bioativas são compostas por plantas medicinais, associadas a efeitos benéficos para a saúde animal, que possuem metabolitos secundários ou compostos anti nutricionais associados ao sabor amargo e adstringente. Estes compostos, frequentes em grande parte da flora, principalmente arbustos, protegem as plantas da predação dos animais (Barry *et al.*, 2001; Coop & Kyriazakis, 2001; Waller & Thamsborg, 2004) e mostram ter efeitos antiparasitários importantes (Iqbal *et al.*, 2002; Durmic & Blache, 2012; Scantlebury *et al.*, 2013).

Couto (2014), observa que a disponibilidade de plantas arbustivas, com elevado nível de taninos, na dieta de asininos em pastoreio, pode contribuir para a manutenção de níveis de parasitismo baixos.

Kyriazakis (2001) observa que compostos antiparasitários naturais presentes nas plantas que constituem a dieta, podem exercer um efeito direto sobre a população de parasitas gastrointestinais. O estudo de Peachey *et al.* (2012) demonstrou eficácia de nove extratos de plantas contra ciatostomíneos parasitas de asininos. Os autores referem que os extratos de *Acacia nilotica*, *Allium sativum*, *Rumex abyssinicus* e *Carica papaya* mostraram maior eficácia, observando uma dose eficaz a 50% (ED-50) nos ensaios de eclosão dos ovos e de migração larval. Segundo os autores, existe evidência na literatura que estes extratos vegetais mostram eficácia tanto *in vitro* como *in vivo* contra várias espécies de nematodes parasitas gastrointestinais de outros hospedeiros, no entanto os autores observam que estas alternativas de tratamento às infecções por ciatostomíneos, exigem uma investigação mais aprofundada.

A grande variedade de medidas alternativas de controlo parasitário, observada nos últimos anos, demonstra a atual importância da redução do uso regular de anti-helmínticos sintéticos (Francisco *et al.*, 2012, Corbett *et al.*, 2014).

As atuais medidas de um controlo sustentável revelam-se importantes pelo facto de não se poder esperar uma reversão da suscetibilidade aos anti-helmínticos pelas populações de nematodes, uma vez que estes já se tornaram resistentes (Matthews, 2014) e pelo facto de não ser espectável que a indústria farmacêutica desenvolva novas classes de anti-helmínticos a uma taxa mais rápida do que o desenvolvimento de resistência (Nielsen, 2012).

A alteração do método de controlo das parasitoses gastrointestinais em equídeos para um controlo baseado em evidências e suportado por melhores práticas clínicas, limitando o uso de anti-helmínticos e garantindo doses corretas, combinadas com o manejo da pastagem e explorando ferramentas de diagnóstico disponíveis, permitirá prolongar a eficácia dos atuais anti-helmínticos até que novos compostos de síntese sejam desenvolvidos. No entanto, existe a necessidade de estudos quantitativos, com evidência científica clara, para demonstrar a sua eficácia (Francisco *et al.*, 2012, Corbett *et al.*, 2014; Matthews, 2014).

Krecek (2014a) refere que em muitas comunidades de África é frequente a remoção das fezes dos animais, atividade que por si só mostra alguma eficácia no controlo de parasitas. Segundo a autora a combinação sinérgica de várias intervenções tende a ser mais eficaz na gestão do controlo de parasitas gastrointestinais, sendo a tendência atual em práticas sustentáveis do controlo integrado a associação da quimioterapia seletiva, com o uso criterioso de anti-helmínticos, e a utilização de fungos nematófagos ou a remoção fecal.

Matthee *et al.* (2002) observaram o impacto da combinação da remoção fecal da pastagem com o tratamento seletivo, com moxidectina. Os autores relataram uma redução na contagem de ovos de estrongilídeos parasitas de asininos de 350 para 200 OPG e uma redução de 26869 para 6683 no número de parasitas.

Kaplan & Nielsen (2010) e Arias *et al.* (2013) referem a importância da utilização de programas, de profilaxia e de desparasitação, ajustados e baseados em evidências sustentáveis, em conjugação com medidas de manejo, higiene e sanidade.

Independente da estratégia utilizada, é necessário o controlo adequado dos parasitas de forma a manter um baixo risco de infeção, pelo que é importante manter um programa de gestão e controlo parasitário rigoroso, regular e consistente (Schneider *et al.*, 2014).

Krecek (2014a) observa que a melhor gestão de controlo parasitário em asininos depende de abordagens práticas, acessíveis, disponíveis e apropriadas.

6.3. Utilização de anti-helmínticos em asininos

Os anti-helmínticos atualmente disponíveis para equinos mostraram ser eficazes para asininos (Crane *et al.* 2011; Matthews & Burden, 2013), no entanto, alguns medicamentos disponíveis no mercado não estão licenciados para uso em asininos. Por outro lado, a dose da substância ativa, de alguns medicamentos tendo sido formulada para equinos poderá não estar otimizada para utilização em asininos (Matthews & Burden, 2013)

A extrapolação das doses em asininos a partir das doses otimizadas em equinos está relacionada com o facto de serem equídeos, no entanto existem diferenças fisiológicas relevantes que devem ser consideradas (Krecek, 2014). Os asininos adaptaram-se a viver em zonas áridas e a prosperar com forragem de baixa qualidade, adaptações associadas a diferenças fisiológicas entre asininos, cavalos e pôneis (Grosenbaugh *et al.*, 2011). Estas diferenças interespecíficas, entre os asininos e equinos, podem interferir nos mecanismos farmacodinâmicos e na farmacocinética, alterando a distribuição, metabolização e excreção dos xenobióticos (Giorgi *et al.*, 2015), pelo que o asinino não deve ser tratado como um “pequeno equino” (Krecek, 2014).

A escolha do anti-helmíntico e dos protocolos de desparasitação são decisões, cada vez mais importantes, que visam evitar tratamentos desnecessários ou ineficazes (Matthews, 2014), pelo que a escolha do anti-helmíntico deve ser baseada em evidência clínica de doença, assim como no diagnóstico etiológico, níveis de infeção e eficácia do anti-helmíntico (Matthews *et al.*, 2014).

Em alguns países europeus como a Dinamarca, Suécia, Holanda e Finlândia houve restrição do uso de anti-helmínticos, sendo necessária receita médica e diagnóstico para cada tratamento pelo que, desta forma, o médico veterinário passa a ser o único responsável pela escolha do anti-helmíntico e estratégia de controlo utilizada (Nielsen, 2012).

Em Portugal, Lopes (2014), verificou os equídeos são desparasitados com ivermectina (90,0%), moxidectina (3,0%), pamoato de pirantel (3,0%) e febendazol (1,5%). Vários autores referem que a ivermectina, isolada ou em associação com praziquantel, tem sido a substância ativa mais utilizada no controlo parasitário de equídeos no nosso país (Madeira de Carvalho, 2001; Gersão, 2005; Martins & Madeira de Carvalho, 2007; Frouco, 2012).

Os anti-helmínticos disponíveis para uso em asininos no Reino Unido foram revistos por Matthews & Burden (2013) e encontram-se referidos no Quadro 4.

Quadro 4 - Anti-helmínticos utilizados no tratamento de helmintoses em asininos (adaptado de Matthews & Burden, 2013).

Grupo de anti-helmíntico	Composto	Indicação	Dose Via oral	Modo de ação	Efeitos no parasita
Lactonas Macrocíclicas	Ivermectina	Nematodes gastrointestinais <i>Dictyocaulus arnfieldi</i>	0,2 mg/kg	Competidor dos recetores GABA Interfere na transmissão nervosa (Canais de Glutamato e Cloro)	Paralisia flácida Inibição da ingestão e deglutição
	Moxidectina*	Nematodes gastrointestinais <i>Dictyocaulus arnfieldi</i> Larvas de ciatostomíneos	0,4 mg/kg	Idem	Idem
Benzimidazóis	Febendazol †	Nematodes gastrointestinais	7,5 mg/kg ou 7,5 mg/kg** durante 5 dias	Inibe o metabolismo energético com redução de ATP (inibição da fumarase redutase e do transporte de glucose) Bloqueador da polimerização da tubulina	Morte do parasita por exaustão Agente ovicida
	Triclabendazol*	<i>Dictyocaulus arnfieldi</i> <i>Fasciola hepatica</i> imaturo e adulto	18 mg/kg	Idem	Idem
Tetrahidropirimidinas	Pamoato de pirantel	Nematodes gastrointestinais <i>Anoplocephala perfoliata</i>	19 mg/kg 38 mg/kg	Efeito colinérgico nos gânglios nervosos	Paralisia espástica
Pirazinoisoquinolonas	Praziquantel*	<i>Anoplocephala perfoliata</i> Outros cestodes	2,5 mg/kg	Alteração da permeabilidade da membrana (Canais de Cálcio)	Paralisia espástica
Salicilanilidas	Closantel*	<i>Fasciola hepatica</i> adulto	20 mg/kg	Desacoplamento da fosforilação oxidativa Interferência na transmissão de eletrões e síntese de ATP (mitocôndria)	Morte por exaustão e paralisia

* Não licenciado para uso em asininos. Prescrito por CASCATA: <http://www.vmd.defra.gov.uk/pdf/vmgn/VMGNote15.pdf>

** Tratamento para ciatostomínose.

† Existem elevados níveis de resistência de cistostomíneos a este anti-helmíntico, reportado em todo o mundo.

6.3.1. Resistências aos anti-helmínticos

O controlo parasitário baseado em protocolos com tratamentos periódicos e sem recurso a diagnóstico de infeção ou evidência clínica, amplamente utilizado em equídeos, terá permitido seleccionar alelos de resistência nas populações de nematodes (Kaplan & Nielsen, 2010).

Shalaby (2013), observa que a utilização frequente do mesmo grupo de anti-helmínticos, assim como o uso frequente e contínuo de um único anti-helmíntico, o uso de doses sub-ótimas e o tratamento profilático de animais domésticos em massa, são fatores que têm contribuído para o desenvolvimento generalizado de resistências a anti-helmínticos em helmintes.

A ocorrência da resistência de ciatostomíneos aos benzimidazóis e às tetrahidropirimidinas, tem sido documentada um pouco por todo o mundo (Kaplan, 2004; Boulkaboul *et al.*, 2006; Traversa *et al.*, 2007), sendo atualmente uma observação comum, em estudos de campo, a resistência simultânea a ambas as classes de anti-helmínticos (Kaplan *et al.*, 2004; Traversa *et al.*, 2009, 2012). Fenómeno também observado em nematodes não estrongilídeos, nomeadamente *Parascaris* spp. e *Oxyuris equi* (Reinemeyer, 2012).

A resistência de ciatostomíneos ao febendazol é frequentemente observada em muitas regiões, onde deixou de ser possível utilizá-lo (Traversa *et al.*, 2012; Lester *et al.*, 2013; Relf *et al.*, 2014; Stratford *et al.*, 2014).

Casos de resistência de nematodes dos equídeos ao pirantel foram documentados em vários países, incluindo Inglaterra, Estados Unidos, Itália, Brasil, Suécia, Finlândia (Kaplan, 2002, 2004; Brazik *et al.*, 2006; Comer *et al.*, 2006; Osterman *et al.*, 2007; Traversa *et al.*, 2007b; Lindgren *et al.*, 2008; Näreaho *et al.*, 2011; Canever *et al.*, 2013; Lester *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2013b).

Em Portugal não existem muitos estudos sobre a eficácia dos anti-helmínticos em equídeos, no entanto foram observadas resistências *in vivo* ao pamoato de pirantel e *in vitro* aos benzimidazóis desde a primeira década do novo milénio (Madeira de Carvalho, 2001; Madeira de Carvalho *et al.*, 2003).

Durante os últimos 30 anos, tem-se registado uma verdadeira dependência de ivermectina e moxidectina, no controlo de nematodes em equídeos e, surpreendentemente a resistência é pouco frequente. Contudo vários estudos têm observado uma redução da eficácia das lactonas macrocíclicas (Boersema *et al.*, 2002; Cobb, 2007; Slocombe *et al.*, 2007; Lyons *et al.*, 2009, 2011; Reinemeyer, 2012; Trawford & Burden, 2012; Lyons & Tolliver, 2013), com a redução do período de reaparecimento de ovos após o tratamento com ivermectina e moxidectina (Von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2009, 2007; Molento *et al.*, 2008; Lyons *et*

al., 2008, 2009, 2011; Rossano *et al.*, 2010; Canever *et al.*, 2013; Lyons & Tolliver, 2013; Geurden *et al.*, 2014; Relf *et al.*, 2014).

Desde 1983, ano em que foi comercializada a ivermectina, não foram disponibilizados novos anti-helmínticos sintéticos (Nielsen, 2012), e segundo Nielsen *et al.* (2014b), não existem novas classes de anti-helmínticos a serem desenvolvidas no futuro próximo.

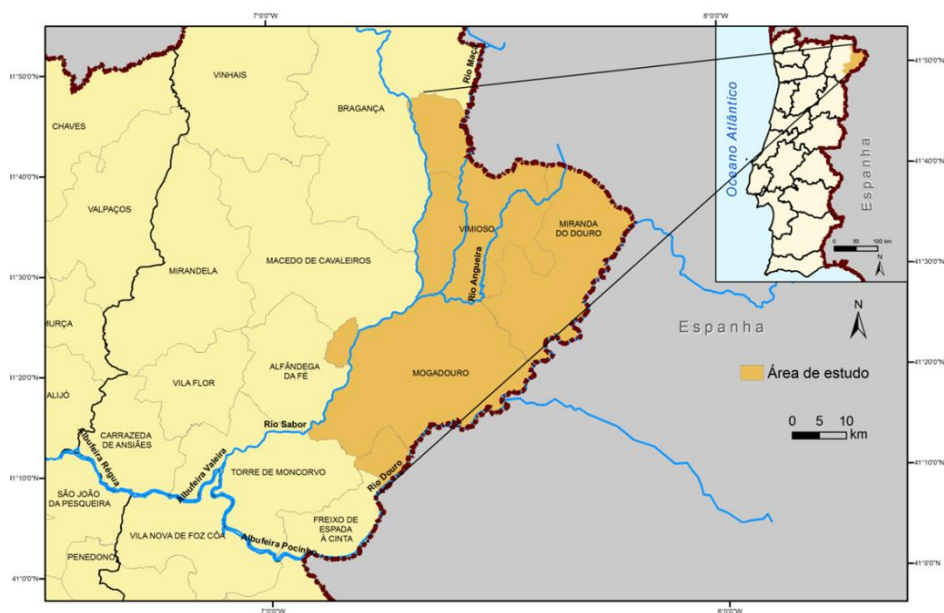
7. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

7.1. Localização dos ensaios

O Planalto Mirandês localiza-se no extremo Nordeste de Portugal Continental, na sub-região do Alto Trás-os-Montes (Gomes *et al.*, 2005; PNDI, 2007; Preto & Sá, 2007; Meirinhos, 2014). Este território, abrange os concelhos de Miranda do Douro, Mogadouro, Vimioso e parte dos concelhos de Bragança, Freixo de Espada-à-Cinta e Torre de Moncorvo, e corresponde ao espaço entre os rios Sabor e Douro, que constituem as fronteiras naturais ocidental e oriental, respetivamente. As elevações da Senhora da Luz, das Melgas e de Mourigo, estabelecem o limite nordeste do território mirandês, bem como a fronteira política de Portugal. A sul, a fronteira natural coincide com o limite sul/sudoeste do planalto de Lagoaça/Fornos (Meirinhos, 2014).

A área retangular deste território é de 2089 quilómetros quadrados, 62 quilómetros de comprimento (norte/sul) por 40 quilómetros de largura (este/oeste), e encontra-se delimitada pelos paralelos de 41°8'Norte e 41°47'Norte e pelos meridianos de 6°10'Oeste e 6°54'Oeste. A norte e a este faz fronteira com a Comunidade Autónoma de Castilla-León, a oeste com os concelhos de Bragança, Macedo de Cavaleiros e Alfândega da Fé e a sul com Freixo de Espada-à-Cinta e Moncorvo (Gomes *et al.*, 2005; PNDI, 2007; Preto & Sá, 2007; Meirinhos, 2014). A localização dos ensaios encontra-se esquematizada na Figura 4.

Figura 4 - Localização do Planalto Mirandês (adaptado de Meirinhos, 2014).



7.1.1. O Planalto Mirandês

7.1.1.1. Caracterização geomorfológica

O Planalto Mirandês consiste num extenso planalto, que integra a Superfície Fundamental da Meseta Ibérica, onde predominam zonas graníticas com 600 a 800 metros de altitude, ocorrendo algumas zonas mais elevadas, acima dos 900 metros, na serra de Mourigo, no extremo norte (Gomes *et al.*, 2005; López-Plaza, 2005; Meirinhos, 2014).

Os vales encaixados, o canhão do rio Douro, os relevos residuais e as geoformas graníticas são elementos geomorfológicos característicos do Planalto Mirandês (Meirinhos, 2014).

A rede hidrográfica do Planalto Mirandês apresenta um carácter bastante encaixado em vales bastante profundos que contrastam com a superfície aplanada envolvente. Os encaixes são mais evidentes quando os rios correm em área graníticas, como exemplo do rio Douro que forma um vale em canhão, com escarpas abruptas superiores a 400 metros em alguns locais (Gomes *et al.*, 2005; Preto & Sá, 2007; Meirinhos, 2014). Quando os rios atravessam rochas metamórficas, como o xisto, formam vales em V mais abertos (Meirinhos, 2014).

Os rios e ribeiras que constituem a rede hidrográfica do Planalto Mirandês apresentam padrões de drenagem bem definidos. Os rios drenam preferencialmente de nordeste para sudoeste, as ribeiras afluentes do rio Douro apresentam uma orientação preferencial de noroeste para sudeste e as ribeiras que drenam para os outros rios, têm quase sempre uma orientação de este para oeste (Meirinhos, 2014).

O clima influencia o regime fluvial dos cursos de água do Planalto Mirandês, sendo muito dependentes da sazonalidade climática anual característica desta região. Durante o verão, os principais rios ficam com os seus caudais muito diminuídos e os cursos de água menos importantes interrompem o seu curso ou secam por completo. Nos anos mais secos os efeitos do clima são mais evidentes do que nos anos mais chuvosos, altura em que os rios e ribeiras apresentam caudais superiores. Pertencem a esta rede hidrográfica os rios Angueira (afluente do rio Maças), Maças (afluente do rio Sabor) e Sabor, afluente do rio Douro (Monteiro *et al.*, 2000; Meirinhos, 2014).

7.1.1.2. Caracterização climática

De acordo com Pôças (2014), o clima da região transmontana define-se como mediterrâneo temperado que, segundo Köppen-Geiger é classificado como Csb por apresentar um clima do tipo temperado, designado por C, em que a temperatura média do mês mais frio oscila entre 0 e 18°C; do subtipo Cs, por existir um período marcadamente seco no verão, e Csb porque a temperatura média do mês mais quente é menor ou igual a 22°C e apresenta, pelo menos, quatro meses com temperatura média superior a 10°C.

Segundo Costa *et al.* (1998), Trás-os-Montes apresenta um bioma de clima temperado quente e um tipo climático xérico árido mesomediterrâneo acentuado.

Meirinhos (2014), refere que as classificações gerais do clima não contemplam as especificidades locais, pelo que é necessária uma análise com maior detalhe.

O Planalto Mirandês insere-se na Terra Fria Transmontana, que corresponde à zona de Trás-os-Montes de menor influência atlântica, caracterizada pelas fortes amplitudes térmicas, com verões quentes e curtos e os invernos frios e longos. As precipitações ocasionais, de chuva ou neve, variam com o relevo (Monteiro *et al.*, 2000; Preto & Sá, 2007). Estes extremos climáticos resultam da continentalidade assim como da morfologia e orientação do relevo da região, com clima classificado como temperado de influência continental (Meirinhos, 2014).

Correia & Martins (2012) referem um estudo do clima em Trás-os-Montes durante o período de 1931 a 1980. Durante 49 anos, a estação meteorológica de Bragança, localizada na região da Terra Fria Transmontana a 41°49'N; 6°46'O, registou o aumento da temperatura média do ar de 11,6 para 11,9°C associada à diminuição do número de dias com temperaturas negativas, de 54 para 46,3 dias, e ao aumento do número de dias com temperaturas superiores a 25°C, de 74 para 76,8 dias. Bragança também registou uma diminuição significativa da precipitação total anual, de 972,1 para 741,1mm. A redução foi observada em 11 meses do ano, sendo mais acentuada durante o mês de janeiro, de 148,8 para 105,4mm. Segundo os autores, esta região de Trás-os-Montes acompanha a tendência geral que se manifesta em Portugal numa aproximação dos invernos, menos rigorosos, com os verões, menos quentes.

7.1.1.3. Caracterização florística

O mosaico de *habitats* com lameiros, campos cultivados e bosques, confere a esta região uma elevada biodiversidade (López-Plaza, 2005).

7.1.1.3.1. Lameiros

Os lameiros são pastagens de montanha que terão surgido durante a Idade Média, em simultâneo com a fundação dos povoados de montanha. Estas pastagens seminaturais de origem centenária constituem um importante *habitat* e um valioso património genético florístico que se concentra nas regiões mais montanhosas de Trás-os-Montes, normalmente a cotas superiores a 700 metros. Os lameiros encontram-se em locais com elevada disponibilidade hídrica e solos com elevado teor de matéria orgânica e textura fina que, quando encharcados, tornam-se lamacentos, facto que terá originado a designação de *lameiros*. O tradicional método de rega de lima, em que a água escorre de modo constante e cobrindo toda a superfície do solo, é utilizado para promover a regulação térmica do solo e da vegetação, de modo a evitar ou reduzir os riscos de congelamento durante o inverno e primavera e a facilitar a reentrada em atividade da vegetação na primavera. Desta forma, os lameiros desempenham um papel determinante na regulação do ciclo da água e dos nutrientes assim como na formação e retenção do solo (Moreira *et al.*, 2001; Pôças, 2014).

Os lameiros são pastagens constituídas por vegetação espontânea e subespontânea, com uma composição florística muito dependente das condições geoclimáticas e da intensidade de pastoreio (Méndez & Aguiar, 2010; Couto, 2014).

De acordo com a disponibilidade hídrica, a composição florística dos lameiros de regadio apresenta maior biodiversidade de plantas de maior valor nutritivo do que a composição florística dos lameiros de sequeiro. Os lameiros com boa disponibilidade hídrica são frequentemente compostos pelas espécies *Holcus lanatus*, *Plantago lanceolata*, *Cynosurus cristatus*, *Hypochaeris radicata*, *Poa trivialis*, *Dactylis gomerata*, *Trifolium pratense* e *Trifolium repens*. Os lameiros de sequeiro são frequentemente compostos por *Agrostis castellana*, *Agrostis fouilladei*, *Trifolium dubium*, *Gaudinia fragilis* e *Arrhenatherum elatius* subsp. *bulbosum* (Moreira *et al.*, 2001).

Pastoreio

O pastoreio controla o desenvolvimento vegetal, atuando como agente de manutenção da pastagem favorecendo o desenvolvimento das plantas mais desejáveis e a persistência de espécies raras. A ausência de pastoreio tem como consequência a perda de biodiversidade, observando-se uma tendência para o aumento da percentagem de gramíneas e consequente diminuição de leguminosas (Méndez & Aguiar, 2010).

Segundo Monteiro *et al.* (2000) e Moreira *et al.* (2001), nas zonas de planalto predominam os cereais e forragens que são usados para pastoreio direto e para a produção de fenos.

Os lameiros de feno são os mais frequentemente encontrados e utilizados em regime misto de corte, para feno no fim da primavera ou início do verão, e pastoreio durante o resto do ano. Estes lameiros podem localizar-se junto a cursos ou nascentes de água permanentes que satisfazem as necessidades de rega durante todo o ano, ou próximos de linhas de água não permanentes e insuficientes para satisfazer as necessidades da pastagem durante o verão (Moreira *et al.*, 2001; Pôças, 2014).

Os lameiros de pastagem destinam-se unicamente ao pastoreio, sendo a base da alimentação do gado autóctone durante o inverno e a primavera. Este tipo de lameiros é normalmente constituído por mato de giesta, urze e carqueja e por pastagens pobres de sequeiro (Moreira *et al.*, 2001). A composição florística dos lameiros de pastagem, onde se pratica o pastoreio direto mais intensivo, é predominantemente composta por espécies menos ingeridas pelos animais como *Rumex crispus*, *Rumex obtusifolius*, *Rumex conglomeratus*, *Mentha suaveolens* e *Brachypodium rupestre* (Moreira *et al.*, 2001; Pôças, 2014).

Os lameiros são a base da alimentação do gado e estão associados à criação de raças autóctones como a Raça Ovina Churra Galega-Mirandesa, a Raça Bovina Mirandesa e a Raça Asinina de Miranda (Monteiro *et al.*, 2000; Méndez & Aguiar, 2010).

Segundo AEPGA (2015a), a composição florística dos lameiros de pastagem pode ser preservada com o pastoreio conjunto de ruminantes e asininos, por estes apresentarem necessidades alimentares distintas. Os ruminantes domésticos preferem leguminosas e outras plantas herbáceas de elevado valor nutritivo, no entanto Couto (2014) refere que os asininos selecionam positivamente vegetação herbácea pouco nutritiva como a silva, a esteva, a giesta e a carqueja. Monteiro *et al.* (2000) e Méndez & Aguiar, (2010) referem que desta forma é possível controlar o desenvolvimento vegetal e exercer um efeito positivo no manejo da pastagem, melhorando a produtividade e qualidade das pastagens e fenos.

7.1.1.3.2. Campos cultivados

As culturas dominantes nas encostas são o olival, a vinha e a amêndoa. No planalto predomina o cultivo de cereais como trigo, aveia e centeio, em rotação com pousios (López-Plaza, 2005). A prática da agricultura extensiva de sequeiro, em regime de minifúndio, faz-se em explorações de média a pequena dimensão, do tipo familiar (FAO, 2010).

7.1.1.3.3. Bosques

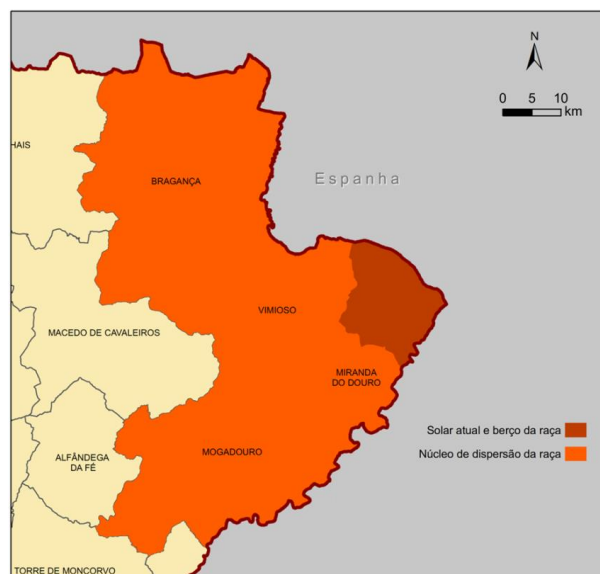
Os bosques ocupam as zonas de altitude média, onde domina o carvalho negral (*Quercus pyrenaica*) e o carvalho cerquinho (*Quercus faginea*) nas zonas mais temperadas. A azinheira (*Quercus ilex*) predomina nos fundos dos vales e nas vertentes voltadas a sul. São comuns os bosques densos, destacando-se os bosques endémicos de zimbro (*Juniperus*) que refugiam mamíferos de grande porte como o corço (*Capreolus capreolus*) e o javali (*Sus scrofa ferus*) (Godinho-Ferreira, 2005; López-Plaza, 2005).

7.2. Raça Asinina de Miranda

Os animais da Raça Asinina de Miranda conservaram as suas características devido, em parte, ao isolamento causado pela sua localização geográfica. São animais adaptados às condições geoclimáticas da Terra Fria Transmontana, do Planalto Mirandês (Samões, 2000; Nóvoa, 2002).

Segundo Quaresma (2005), o norte do concelho de Miranda do Douro corresponde ao solar da Raça Asinina de Miranda, no entanto Meirinhos (2014) refere que a área de dispersão abrange os concelhos de Miranda do Douro, Vimioso, Mogadouro e Bragança, como representado na Figura 5.

Figura 5 - Localização do solar da raça Asinina de Miranda e respetiva área de dispersão (adaptado de Meirinhos, 2014).



7.2.1. Origem

O burro da Raça Asinina de Miranda descende de asininos domésticos do tronco europeu e apresenta características morfológicas e comportamentais muito semelhantes às da Raça Asinina Zamorano-Leonesa (Aranguren-Mendez *et al.*, 2002, 2004).

De acordo com García (1999), esta raça espanhola da província de Zamora terá atravessado a fronteira povoando a região de Trás-os-Montes. Esta expansão terá ocorrido ao longo de toda a fronteira raiana, desde Rio de Onor até Mogadouro, no entanto foi melhor sucedida a norte de Miranda devido ao facto de não existir a fronteira natural do rio Douro e de haver maior proximidade entre as populações de ambos os lados da fronteira, com partilha de pastagens, o que terá facilitado a troca de animais entre ambos os lados da fronteira.

7.2.2. Características distintivas

Estes animais, vulgarmente conhecidos por Burros de Miranda, estão perfeitamente adaptados à Terra Fria do Planalto Mirandês, suportando facilmente as temperaturas extremas e as grandes amplitudes térmicas características desta região transmontana (García, 1999).

Segundo Samões (2000) e Nóvoa (2002), o Burro de Miranda é um animal bem conformado, corpulento e rústico, com mais de um metro e vinte de altura ao garrote. A cabeça é volumosa com fronte larga e levemente côncava na linha mediana, arcadas orbitárias muito salientes, face curta de chanfro largo, canal entre-ganachas largo, lábios grossos e fortes. As orelhas são grandes, largas na base e arredondadas na ponta, e dirigidas para a frente. Com pescoço curto e grosso e o dorso bem musculado, apresenta peitoral amplo com quilha saliente, tórax profundo, costado encurvado e ventre volumoso, garupa em ogiva mais elevada que o garrote. Os membros são grossos de articulações volumosas que conferem andamentos de grande amplitude, mas lentos e pouco ágeis. Os membros são providos de pêlo abundante cobrindo os cascos e machinhos bem desenvolvidos. Com pêlo lanudo grosso, comprido e abundante, o Burro de Miranda apresenta uma pelagem castanha escura, com gradações mais claras nos costados e face inferior do tronco. Os olhos e lábios são rodeados por uma pelagem branca característica.

Os animais da Raça Asinina de Miranda possuem um temperamento de carácter dócil, sóbrio e calmo (Samões, 2000; AEPGA 2015b). São animais de excecional rusticidade, longevidade e polivalência que, apesar de serem domesticados há cerca de 5000 anos, não perderam a sua personalidade e não mostram receio no contacto com os humanos (French, 1999; Samões,

2000).

As características destes animais encontram-se muito relacionadas com as suas funções e utilização, condicionando a sua preferência e escolha pelos criadores. A maioria dos criadores, principalmente os idosos, prefere burros de baixa estatura, que são mais fáceis de montar e de aparelhar. A população idosa prefere as fêmeas por serem mais dóceis, mais calmas e menos agressivas do que os machos. Os machos inteiros não são, frequentemente, utilizados por serem mais agressivos, terem mais força e maior porte (Samões, 2000).

As características físicas destes animais encontram-se também muito relacionadas com outras razões, de carácter subjetivo, pessoal ou do imaginário popular, resultantes do gosto popular pela cor ou pelo comprimento do pêlo dos asininos (Samões, 2000).

7.3. Técnicas parasitológicas

Segundo Madeira de Carvalho (2001), técnicas parasitárias adequadas permitem realizar estudos epidemiológicos sobre o parasitismo intestinal por *estrongilídeos* em equídeos. As análises coprológicas permitem conhecer o nível de infeção e biodiversidade parasitária no hospedeiro, assim como técnicas adequadas permitem observar a contaminação ambiental.

7.3.1. Parasitismo e biodiversidade por técnicas coprológicas

O procedimento de colheita da amostra fecal, a sua conservação e envio ao laboratório, assim como o seu processamento laboratorial podem condicionar o diagnóstico coprológico (Bussiéras & Chermette, 1991; Taylor *et al.*, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

7.3.1.1. Colheita de fezes

A colheita de fezes para exame parasitológico pode ser individual ou em grupo e sempre que possível a partir da ampola rectal do animal. É facilmente realizada por palpação rectal nos grandes animais, com o auxílio de luva obstétrica descartável ou saco de plástico, com lubrificante para reduzir o desconforto do animal (Foreyt, 2001; Zajac & Conboy, 2012).

A colheita da amostra fecal a partir do solo é menos recomendada do que a anterior e deve ser realizada colhendo pequenas porções da superfície e do interior da matéria fecal recentemente

emitida (Zajac & Conboy, 2012). A exposição e permanência da amostra fecal às condições ambientais pode, não só alterar a sua composição como, permitir a sua invasão por organismos coprófagos de vida livre, que contaminam a amostra com ovos e larvas e ainda permitir o desenvolvimento dos organismos parasitas presentes, alterando a sua viabilidade e morfologia (Soulsby, 1986; Zajac & Conboy, 2012). As alterações morfológicas das formas parasitárias presentes na amostra fecal podem dificultar um correto diagnóstico parasitológico (Taylor *et al.*, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

A colheita de fezes a um grupo de animais deve ser realizada de forma a se obter uma amostra representativa. Segundo Soulsby (1986) e Zajac & Conboy (2012), devem ser colhidas amostras a cerca de 10% dos animais, alguns dos quais doentes e outros saudáveis.

Segundo Soulsby (1986), em cada animal deve-se colher entre 50 a 100 gramas de fezes. No entanto, e segundo o mesmo autor, sempre que possível deve-se respeitar a indicação de 500 gramas de fezes para equídeos.

7.3.1.2. Conservação das fezes

Quando o diagnóstico parasitológico não pode ser realizado logo após a defecação, a amostra fecal deve ser acondicionada e conservada (Thienpont *et al.*, 1986).

A amostra pode permanecer no interior da luva ou saco de plástico, utilizados na recolha, ou pode ser transferida para um frasco de vidro ou de plástico com tampa hermética. O recipiente que acondiciona a amostra fecal deve ser estanque e impermeável, não deve ser nunca de material poroso como cartão ou madeira, de forma a impedir a desidratação da amostra com consequente alteração das formas parasitárias (Taylor *et al.*, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

A amostra fecal deve permanecer sem ar, de forma a atrasar o desenvolvimento das formas parasitárias (Bussiéras & Chermette, 1991).

A conservação temporária da amostra fecal por refrigeração, entre 4 a 5°C, permite interromper o desenvolvimento das formas parasitárias sem as inviabilizar, podendo ocorrer a retoma do seu desenvolvimento em laboratório (Bussiéras & Chermette, 1991; Zajac & Conboy, 2012).

Para atrasar ou mesmo interromper o desenvolvimento das formas parasitárias presentes numa amostra fecal é necessário acondicioná-la em recipiente hermético e refrigerá-la à temperatura de 4 a 5°C (Bussiéras & Chermette, 1991; Taylor *et al.*, 2007). Com este procedimento é possível conservar as formas parasitárias durante uma semana sem se observar alterações morfológicas consideráveis (Kassai, 1999).

A conservação definitiva das fezes com recurso a líquidos fixadores, como etanol a 70% e formaldeído a 10%, não permite o desenvolvimento posterior das formas parasitárias. Deste modo quando se pretende identificar parasitas por coprocultura a conservação definitiva não deve ser utilizada (Bussiéras & Chermette, 1991; Zajac & Conboy, 2012).

7.3.1.3. Envio da amostra fecal ao laboratório

A amostra fecal deve ser enviada ao laboratório perfeitamente acondicionada, conservada e corretamente identificada com a data, número e origem da colheita (Zajac & Conboy, 2012).

A amostra deve ser acompanhada por um relatório com todas as indicações importantes para um correto diagnóstico laboratorial (Thienpont *et al.*, 1986). Os dados sobre o animal, o proprietário, o médico veterinário assistente, a localidade, a doença ou parasitose suspeita, assim como o número de animais afetados ou mortos, sintomas e lesões, podem ser importantes para a realização de um correto diagnóstico coprológico (Zajac & Conboy, 2012).

7.3.1.4. Procedimento geral dos exames fecais

Independentemente do procedimento laboratorial a desenvolver,    necessário respeitar as regras básicas de higiene de forma a diminuir a disseminação de formas parasitárias para o meio ambiente (Bussiéras & Chermette, 1991).

Em helmintologia, a coprologia recorre frequentemente    observação direta da amostra fecal assim como    identificação morfológica das formas parasitárias como ovos, larvas e parasitas adultos. Deste modo o conhecimento da sua morfologia    necessário para um correto diagnóstico parasitológico direto (Taylor *et al.*, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

7.3.1.4.1. Exame macroscópico

O exame macroscópico das fezes pode auxiliar e orientar o diagnóstico parasitológico. A aparência geral das fezes, a sua consistência e cor devem ser normais para o hospedeiro em causa (Taylor *et al.*, 2007). A alteração destas características pode indicar alguma infeção parasitária (Zajac & Conboy, 2012). O exame macroscópico das fezes permite realizar o diagnóstico parasitológico direto avaliando a presença de parasitas adultos ou fragmentos

destes na amostra de fezes, nomeadamente larvas de *Gasterophilus* spp., proglotes ou adultos de Anoplocephalidae, larvas L4 e adultos de Cyathostominae (Bussiéras & Chermette, 1991; Zajac & Conboy, 2012).

7.3.1.4.2. Exame microscópico

A identificação das formas parasitárias cujas dimensões são inferiores ao limite de resolução do olho humano, como ovos e larvas de helmintes, s    possível por observação microscópica das fezes (Bussiéras & Chermette, 1991).

Fezes frescas

O exame microscópico direto das fezes frescas, em preparações lâmina-lamela, permite fazer um diagnóstico parasitológico correto, no entanto este exame coprológico apresenta uma baixa sensibilidade pela ocorrência frequente de resultados falsos negativos. O facto de se observar uma pequena amostra fecal numa preparação microscópica com muito resíduo, na qual se encontram diluídas as formas parasitárias, dificulta o correto diagnóstico parasitológico (Bussiéras & Chermette, 1991; Zajac & Conboy, 2012).

Exames fecais de concentração ou enriquecimento

Os exames fecais de concentração ou enriquecimento são os mais frequentemente utilizados em coprologia veterinária (Zajac & Conboy, 2012).

Estes exames permitem separar as formas parasitárias dos constituintes fecais e concentr -las de modo a facilitar a sua observação. Para suspender e separar os constituintes fecais   necessária a utilização de uma solução que permita diluir a amostra fecal. Após obter uma suspensão fecal   possível estratificar os constituintes de acordo com as suas densidades ou gravidade específica. Esta estratificação pode ser lenta, devido apenas   a  o da força da gravidade, ou rápida com a aplicação de uma força centrífuga. A centrifugação permite uma melhor separação entre as formas parasitárias e os restantes constituintes fecais, aumentando a sensibilidade dos métodos, sendo particularmente importante quando o número de formas parasitárias é muito baixo ou quando se utilizam soluções viscosas que atrasem a separação dos vários constituintes fecais (Taylor *et al.*, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

Quando não é possível centrifugar e não se pretende uma diminuição da sensibilidade do exame fecal, é frequente utilizar uma maior amostra fecal ou um período de repouso mais longo (Zajac & Conboy, 2012).

Os exames fecais de concentração mais frequentemente utilizados baseiam-se na sedimentação ou na flutuação das formas parasitárias (Bussiéras & Chermette, 1991; Zajac & Conboy, 2012).

Métodos de sedimentação

Os métodos de sedimentação utilizam soluções diluidoras menos densas do que as formas parasitárias e mais densas do que os restantes constituintes fecais. A diluição da amostra fecal em água, solução com gravidade específica de um, permite a sedimentação de formas parasitárias mais densas e a flutuação dos restantes constituintes fecais, menos densos do que a água. As formas parasitárias concentram-se no sedimento de onde são facilmente recuperadas e observadas (Zajac & Conboy, 2012). Estes métodos de sedimentação são frequentemente utilizados para pesquisa de ovos de trematodes, cuja densidade é superior a 1.4, sendo os ovos de nematodes e cestodes, de densidade inferior a 1.2, frequentemente observados em métodos de flutuação (Thienpont *et al.*, 1986).

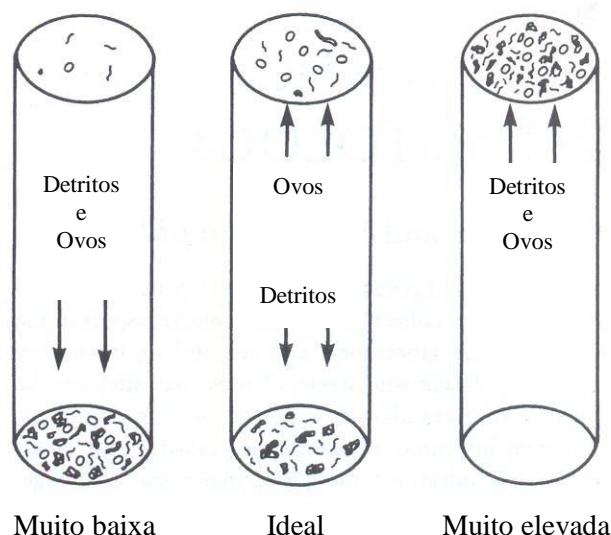
Métodos de flutuação

Os métodos que se fundamentam na flutuação utilizam soluções mais densas do que as formas parasitárias e menos densas do que os restantes constituintes fecais de modo a estratificá-los e separá-los de acordo com a gravidade específica. Deste modo as formas parasitárias concentram-se à superfície da mistura fecal, de onde podem ser facilmente recuperadas e observadas por microscopia, e os restantes constituintes fecais sedimentam (Zajac & Conboy, 2012).

As soluções de flutuação podem ser escolhidas de acordo com a sua gravidade específica e composição. As soluções mais frequentemente utilizadas em métodos de flutuação compreendem limites de gravidade específica entre 1.10 e 1.35, a 20°C (Kassai, 1999; Zajac & Conboy, 2012). Soluções de flutuação com gravidade específica entre 1.10 e 1.20 permitem a flutuação de uma grande variedade de formas parasitárias, como ovos e larvas da maioria dos nematodes e ovos de cestodes (Bussiéras & Chermette, 1991; Foreyt, 2001; Taylor *et al.*, 2007). A flutuação de ovos de trematodes só é possível com soluções muito densas, com 1.30 a 1.35 de gravidade específica (Taylor *et al.*, 2007). O aumento da gravidade específica da solução promove a flutuação de mais constituintes fecais e aumenta o risco de deformação das

formas parasitárias, dificultando a sua observação (Figura 6) (Foreyt, 2001; Zajac & Conboy, 2012).

Figura 6 - Efeito da gravidade específica na flutuação dos ovos (Foreyt, 2001).



As soluções de flutuação utilizadas em parasitologia veterinária incluem solução de açúcar a 1.20 e 1.25 de gravidade específica e várias soluções salinas como soluções de Nitrato de Sódio (NaNO_3) a 1.20 e 1.30, Sulfato de Zinco (ZnSO_4) a 33% com 1.18 de densidade, Cloreto de Sódio (NaCl) a 1.20 e Sulfato de Magnésio (MgSO_4) a 1.32 (Kassai, 1999; Zajac & Conboy, 2012).

Kassai (1999) considera que a solução de flutuação de açúcar permite uma boa separação entre os constituintes fecais, cristaliza lentamente e mantém as formas parasitárias sem alterações morfológicas durante alguns dias. Segundo Thienpont *et al.* (1986), as soluções salinas são preferíveis à solução de açúcar devido à menor viscosidade e ao maior período de conservação.

7.3.1.4.3. Coprologia qualitativa

Os exames fecais qualitativos são os mais frequentemente utilizados em coprologia veterinária e permitem avaliar a ocorrência de infecção parasitária pela presença de formas parasitárias nas fezes. A presença de apenas uma forma parasitária permite concluir que o animal se encontra parasitado (Foreyt, 2001).

Limitações

O exame coprológico qualitativo é negativo quando não se observa, pelo menos uma forma parasitária na amostra fecal analisada, contudo um resultado negativo isolado não permite concluir a ausência real de infecção (Foreyt, 2001).

As formas parasitárias podem não ser observadas se ocorrerem em número muito baixo, se a análise coprológica for efetuada durante a fase pré-patente da infecção, período em que ainda não há eliminação de formas parasitárias para o exterior, se a análise for realizada durante a fase de hipobiose, em que há uma paragem no desenvolvimento dos estádios larvares, ou se existirem apenas parasitas machos (Taylor *et al.*, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

Os vários métodos utilizados em coprologia qualitativa permitem realizar diagnósticos de rotina observando a presença ou ausência de infecções parasitárias mas não permitem estimar o grau de infecção parasitária (Foreyt, 2001; Zajac & Conboy, 2012).

7.3.1.4.4. Coprologia quantitativa

A maioria dos exames coprológicos quantitativos são também exames fecais de concentração, de flutuação ou de sedimentação das formas parasitárias, e permitem o diagnóstico de parasitismo assim como determinar o número de ovos por grama de fezes (OPG) e consequentemente estimar o nível de infecção parasitária (NIP) (Taylor *et al.*, 2007; Zajac & Conboy, 2012). Desta forma a coprologia quantitativa permite orientar um diagnóstico clínico, auxiliar na escolha da terapêutica, controlar a eficácia do tratamento e ainda estudar o ciclo de vida dos parasitas (Zajac & Conboy, 2012).

A mensuração do peso de fezes e do volume de solução diluente utilizados permite comparar os resultados obtidos pelos diferentes métodos quantitativos e pelos diferentes manipuladores ou laboratórios (Bussiéras & Chermette, 1991).

Segundo Soulsby (1986), a interpretação dos métodos quantitativos deve ser cuidada e individual por haver múltiplos fatores condicionantes. Embora pouco objetiva, a avaliação dos resultados destes métodos permite determinar o limiar a partir do qual a infecção parasitária passa a doença parasitária ou parasitose. Desta forma, na contagem de ovos de *estrongilídeos* intestinais, valores inferiores ou iguais a 500 OPG sugerem a ocorrência de uma infecção parasitária leve; entre 800 e 1000 OPG uma infecção moderada, a partir da qual o animal manifesta sintomatologia; e entre 1500 a 2000 uma infecção grave.

A experiência mostra que em geral o nível de infecção parasitária é fraco para valores inferiores a 500 OPG, médio entre os 500 e 1000 OPG, forte quando os valores são superiores a 1000 OPG (Madeira de Carvalho *et al.*, 2003).

Segundo Bussiéras & Chermette (1991) e Nielsen *et al.* (2010b), o tratamento antiparasitário, dos equinos parasitados por estrongilídeos intestinais, deve ser realizado a partir de 500 OPG. Soulsby (1986) e Trawford & Burden (2012), consideram o tratamento para valores iguais ou superiores a 1000 OPG.

No entanto vários autores têm recomendado o tratamento quando os valores são superiores a 200 OPG, embora este limiar seja bastante baixo para a maioria das contagens de ovos em equídeos, podendo concorrer para desparasitações mais frequentes, logo para uma maior possibilidade de resistência aos anti-helmínticos (Krecek *et al.*, 1994; Bowman *et al.*, 2003; Becher *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2012c; Relf *et al.*, 2013).

Foreyt (2001) considera esta avaliação pouco objetiva visto que a manifestação de sintomatologia depende de muitos fatores relacionados com o hospedeiro, o parasita e o meio ambiente.

Limitações

Os limites da coprologia quantitativa são inerentes ao próprio fen meno do parasitismo e à complexidade das relações estabelecidas entre o hospedeiro, o parasita e o meio ambiente (Zajac & Conboy, 2012). Ainda não há valores que contemplem estas variáveis na interpretação dos resultados dos exames coprológicos quantitativos (Kassai, 1999; Zajac & Conboy, 2012).

Segundo Soulsby (1986), para esta interpretação complexa e multifatorial ser útil   necessário individualizá-la considerando sempre os dados clínicos do animal parasitado.

Os fatores que fazem variar a quantidade de ovos emitidos nas fezes do hospedeiro podem interferir de forma significativa com os resultados dos métodos quantitativos (Foreyt, 2001). Segundo Zajac & Conboy (2012), as flutuações sazonais, quotidianas ou horárias, do ciclo de postura de ovos encontram-se relacionadas com múltiplos fatores como a biologia do parasita, a imunidade do hospedeiro e o clima.

Os estados nutricionais e imunitários, que conferem resistência ou vulnerabilidade do hospedeiro   infecção, podem influenciar de forma negativa ou positiva a ovulação do parasita fêmea. A resistência do hospedeiro pode diminuir ou anular a produção de ovos e a depressão imunitária do hospedeiro podem fazer aumentar o número de ovos por postura (Foreyt, 2001).

As infecções parasitárias podem causar doença sem haver eliminação de ovos para o meio exterior. As formas imaturas dos parasitas podem ser altamente patogênicas e não eliminam ovos pelas fezes (Kassai, 1999; Foreyt, 2001).

São frequentes infecções parasitárias mistas em que várias espécies apresentam associações entre si (Bucknell *et al.*, 1996; Matthews, 1998; Anjos & Rodrigues, 2006; Zajac & Conboy, 2012).

Algumas formas parasitárias como ovos de strongilídeos são difíceis de diferenciar entre si e representam várias espécies com potenciais bióticos e patogenicidades diferentes. Assim, um strongilídeo muito fecundo mas de baixa patogenicidade pode aumentar muito a contagem de ovos e condicionar a interpretação do diagnóstico. Por outro lado, a ausência ou a presença de um pequeno número de ovos não significa necessariamente que o hospedeiro não sofra de uma helmintose, um strongilídeo muito patogênico pode ficar mascarado sob uma contagem relativamente baixa (Kassai, 1999; Foreyt, 2001).

A quantidade de fezes emitida afeta de forma inversa o número de ovos por unidade de peso. A contagem de ovos por unidade de peso diminui com o aumento do volume de fezes emitidas diariamente pelo hospedeiro (Thienpont *et al.*, 1986).

Os procedimentos de recolha, conservação e processamento da amostra fecal devem ser considerados na interpretação dos resultados dos métodos quantitativos (Zajac & Conboy, 2012). Erros de amostragem relacionados com a distribuição heterogênea das formas parasitárias nas fezes devem ser evitados com uma correta técnica de recolha e homogeneização da amostra (Kassai, 1999).

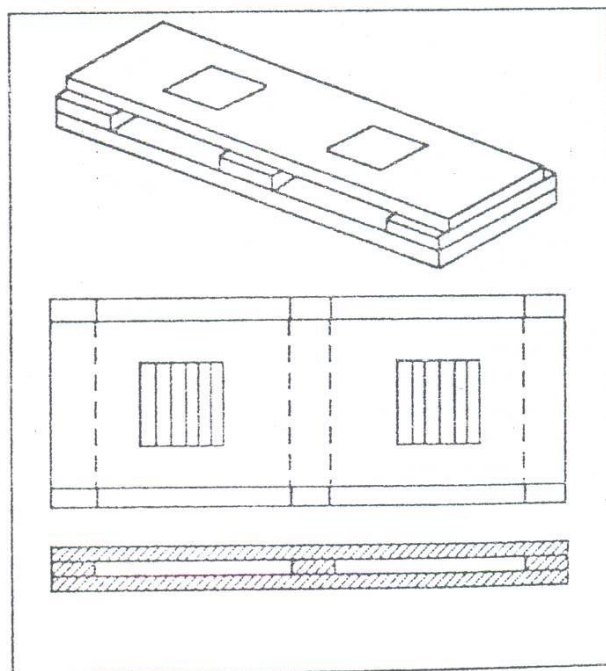
A consistência da amostra fecal deve ser considerada na interpretação dos resultados visto que as fezes líquidas apresentam uma maior dispersão das formas parasitárias do que as fezes secas (Soulsby, 1986). Segundo o mesmo autor a contagem do número de ovos por grama de fezes pode ser corrigida ajustando o peso de fezes à sua consistência, desta forma e para o mesmo volume de solução diluente utilizar duas gramas de fezes normais, duas gramas e meio de fezes ligeiramente moles, três gramas de fezes moles, cinco gramas de fezes muito moles e sete gramas de fezes líquidas.

Os métodos quantitativos apresentam uma baixa sensibilidade visto que apenas permitem determinar valores iguais ou superiores a 50 OPG. Para valores inferiores a 50 OPG a maioria dos métodos quantitativos de rotina não dão resposta eficaz (Zajac & Conboy, 2012).

Método de McMaster modificado

O método de McMaster modificado é um método simples de contagem de ovos que utiliza uma câmara de contagem formada por duas lâminas, uma superior e outra inferior, separadas por um milímetro e meio uma da outra (Figura 7). A lâmina inferior constitui o fundo e, a lâmina superior o teto da câmara. A lâmina superior apresenta dois quadrados gravados na sua face inferior, cada um com dez milímetros de lado. Cada quadrado constitui numa área ou célula de contagem e apresenta uma grelha de contagem. Cada célula de contagem, com 100mm^2 de área e 1,5mm de altura, apresenta um volume total de 150mm^3 (0,15ml). Como uma câmara de contagem apresenta duas células de contagem o volume total é de 0,30ml (Kassai, 1999; Zajac & Conboy, 2012).

Figura 7 - Câmara de contagem McMaster (Adaptado de Bussieras & Chermette, 1991).



É possível utilizar uma grande variedade de soluções de flutuação, salinas ou de açúcar. A mistura do material fecal com a solução diluente escolhida deve ser feita de forma a obter uma suspensão fecal, sendo esta técnica de homogeneização responsável, em grande parte, pelo êxito do método (Thienpont *et al.*, 1986; Zajac & Conboy, 2012).

A relação entre o peso de fezes e o volume de solução de flutuação deve ser constante e de um grama de fezes para 14 mililitros de solução, perfazendo 15 mililitros de volume total de suspensão fecal (Kassai, 1999). Ao aumentar o peso de fezes utilizado aumenta-se também e

em igual proporção o volume da solução de flutuação, como por exemplo, ao utilizar duas gramas de fezes diluídas em 28 mililitros de solução de flutuação perfaz-se um volume total de 30 mililitros de suspensão fecal (Zajac & Conboy, 2012).

A suspensão fecal pode ser filtrada, através de um tamis de malha larga, para eliminar as partículas fecais de maior diâmetro e facilitar a sua transferência para a câmara de McMaster (Foreyt, 2001; Zajac & Conboy, 2012).

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, transferir a suspensão fecal de forma a encher as duas células de contagem sem formar bolhas de ar. A presença de ar nas células de contagem altera o volume de contagem (Bussiéras & Chermette, 1991).

A câmara de McMaster é colocada sobre a platina de um microscópio  tico e deixa-se repousar durante alguns minutos antes da observação microscópica. Durante este período de repouso ocorre a separação das formas parasitárias dos detritos fecais. Os ovos flutuam e aderem na fase inferior da lâmina superior da câmara e os detritos fecais sedimentam sobre a lâmina inferior da câmara (Kassai, 1999).

A observação microscópica deve ser realizada com baixa ampliação, a 40 ou 100 vezes, e focando a fase inferior da lâmina superior onde se encontra gravada a grelha de contagem e se pode identificar e contar as formas parasitárias (Thienpont *et al.*, 1986).

A contagem das formas parasitárias deve ser metódica de forma a evitar erros. Todas as formas parasitárias que se encontrarem dentro dos limites da grelha de contagem devem ser contadas e as que se sobrepuserem aos limites devem ser consideradas de acordo com o método de contagem que se adotar. De acordo Zajac & Conboy (2012) devem ser contadas as formas parasitárias que se encontrarem sobre os limites superior ou inferior, direito ou esquerdo e devem ser ignoradas as restantes.

A contagem deve ser diferenciada de forma a separar as diferentes formas parasitárias por grupos, g  neros ou espécies de parasitas (Foreyt, 2001; Zajac & Conboy, 2012).

Para calcular o número de ovos por grama de fezes (OPG)   necessário considerar que em 30 mililitros de suspensão fecal encontram-se duas gramas de fezes e que são contados os ovos existentes em apenas 0,30ml, volume das duas células da câmara de McMaster. Sabendo que 0,30ml são apenas 1/100 dos 30ml da suspensão fecal, para o cálculo de OPG   necessário multiplicar o fator de correção 100 ao número de ovos contados e dividir por dois. Porém, multiplicar por 100 e dividir por dois é equivalente a multiplicar por 50 (Zajac & Conboy, 2012).

Desta forma, segundo Thienpont *et al.* (1986), para calcular o OPG   necessário multiplicar o número de ovos contados, nas duas células de contagem da câmara de McMaster, pelo fator de correção 50, ou   média de ovos contados   necessário multiplicar o fator de correção 100.

Zajac & Conboy (2012) referem que a média do número de ovos contados, em ambas as células de contagem, é um valor que representa um desvio padrão médio inferior a 25% pelo que é recomendado para o cálculo de valores corretos de OPG.

O método de McMaster modificado apresenta uma baixa sensibilidade visto que apenas permite determinar valores iguais ou superiores a 50 OPG (Kassai, 1999; Foreyt, 2001; Zajac & Conboy, 2012). Para aumentar a sensibilidade deste método é necessário aumentar a concentração da suspensão fecal diluindo, por exemplo, quatro gramas de fezes em 26 mililitros de solução de flutuação o valor do limiar passa de 50 para 25 OPG (Zajac & Conboy, 2012).

7.3.1.5. Coprocultura

Segundo Foreyt (2001), as semelhanças morfológicas dos ovos dos diferentes strongilídeos parasitas gastrintestinais dificultam a sua diferenciação e quando não é possível um diagnóstico diferencial, do género ou da espécie, a partir da sua observação morfológica pode-se recorrer à coprocultura.

A coprocultura é uma técnica coprológica laboratorial que permite diagnosticar os vários géneros e espécies de nematodes parasitas de ciclo monoxeno, pela observação morfológica das larvas do terceiro estágio de desenvolvimento (Bussiéras & Chermette, 1991; Foreyt, 2001). Esta técnica consiste em proporcionar as condições ideais de temperatura, humidade, oxigenação e pH para o desenvolvimento das formas parasitárias. O ovo embriona e desenvolve-se a larva do primeiro est  dio de desenvolvimento (L1) que eclode e continua o desenvolvimento no meio ambiente para o segundo (L2) e posteriormente para o terceiro (L3) est  dio de desenvolvimento, est  dio infetante. As larvas do terceiro est  dio de desenvolvimento são morfolologicamente estáveis, uma vez que o seu desenvolvimento posterior são ocorre após a infeção do hospedeiro definitivo adequado, e permitem o diagnóstico de género ou de espécie através dos seus caracteres morfológicos (Soulsby, 1986).

A identificação das larvas infetantes dos strongilídeos parasitas de equídeos    indispensável para o estudo da sua biologia e patogenia, assim como para ajustar a terapêutica adequada (Madeira de Carvalho, 2001).

7.3.1.5.1. Cultivo de fezes

Para que a cultura de fezes tenha êxito é necessário considerar alguns princípios gerais comuns a todos os métodos de coprocultura (Zajac & Conboy, 2012). Os cuidados com a colheita de fezes, conservação e envio para o laboratório assumem uma grande importância para esta técnica (Soulsby, 1986).

A amostra fecal a utilizar deve ser friável e húmida, para o efeito é necessário homogeneizar a amostra de forma e incorporar ar e acertar a sua humidade. Se a amostra de fezes estiver muito seca deve-se adicionar água de forma a ficar húmida, mas não aquosa, e se estiver muito líquida deve-se adicionar um suporte neutro para aumentar a sua consistência e oxigenação. O material ou suporte usado deve ser estéril e conferir uma consistência esponjosa e porosa à mistura. São exemplos o carvão vegetal, fezes de cavalo esterilizadas, turfa, aparas de madeira e serradura (Foreyt, 2001).

A mistura deve ser transferida para recipiente de vidro ou plástico e após acondicionamento, que depende do método utilizado, é colocada em estufa com temperatura regulada entre os 25 e 27°C e humidade relativa entre os 70 e 80%, durante sete a dez dias. Durante o tempo de incubação, período de desenvolvimento larvar até ao estágio infetante, a humidade pode ser assegurada pela própria estufa, com ventilação e humidade controladas, ou através de recipientes com água, colocados no interior da estufa juntamente com as amostras fecais (Zajac & Conboy, 2012).

Segundo Soulsby (1986) e Blood *et al.* (1989), quando são reunidas as condições ótimas de temperatura e humidade, o período de desenvolvimento do ovo até à larva infetante pode variar entre os cinco e os sete dias. Porém, o período de incubação pode variar com o parasita. Segundo Medica & Sukhdeo (1997) o terceiro estágio de desenvolvimento larvar da espécie *Strongylus vulgaris* desenvolve-se em aproximadamente duas semanas e deste modo a coprocultura de fezes de equídeo deverá prolongar-se até cerca de 14 dias. Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004), referem que a coprocultura prolongada permite o desenvolvimento de um grande número de espécies diferentes, cuja duração do ciclo exógeno é pouco ou nada conhecida.

A incubação pode decorrer na bancada do laboratório, à temperatura e humidade relativa ambientais. Neste caso, as condições de desenvolvimento larvar poderão ser similares às do meio ambiente, não se podendo, contudo, controlá-las. Nestas condições o tempo de desenvolvimento pode ser irregular e o período de incubação pode variar entre os 10 e os 20 dias (Foreyt, 2001).

Durante o período de incubação pode haver crescimento de fungos prejudiciais ao desenvolvimento dos estádios larvares de vida livre. Este crescimento pode ser inibido com o arejamento das camadas mais profundas da massa fecal, revolvendo diariamente o cultivo para incorporar ar (Foreyt, 2001; Zajac & Conboy, 2012).

7.3.1.5.2. Recolha das larvas

Todos os métodos utilizados na recolha de larvas infetantes têm como fundamento o seu comportamento migratório (Zajac & Conboy, 2012). Segundo Soulsby (1986), as L3 ativas reagem a estímulos externos deslocando-se desde a massa fecal até ao ambiente circundante respondendo a tropismos positivos à luz suave, à água e à temperatura moderada, sendo que as migrações larvares são mais ativas quando a temperatura ambiente está entre os 25 e 28°C. Em laboratório podem ser recriados os estímulos externos necessários à migração das larvas infetantes que respondem abandonando a massa fecal. Desta forma podem ser isoladas e concentradas, limpas de resíduos fecais (Foreyt, 2001).

Os métodos mais frequentemente utilizados na recolha de larvas infetantes são os que utilizam o aparelho de Baermann, o copo cónico e a placa de Petri (Thienpont *et al.*, 1986; Zajac & Conboy, 2012).

Aparelho de Baermann

O aparelho de Baermann consiste num funil suspenso por um suporte. Na abertura inferior, mais estreita, do funil encontra-se um tubo de borracha com um sistema de mola metálica que permite fechar ou abrir. Coloca-se água e um tamis, no interior do funil, de modo que a superfície água toque no tamis. Transfere-se o cultivo fecal da estufa para o tamis. Deixa-se repousar durante 12 a 24 horas para que as L3 possam migrar para a água e aí se concentrarem, no fundo do funil, de onde são recolhidas para serem observadas (Thienpont *et al.*, 1986; Kassai, 1999; Zajac & Conboy, 2012).

Copo cónico

As fezes do cultivo são transferidas para uma pequena gaze de área quadrangular, de modo que se faça uma pequena trouxa, amarrando os ângulos opostos da gaze com as fezes no seu interior. A trouxa de fezes deve ser colocada num copo cónico cheio de água, de forma que

flutue à superfície. Deixar repousar durante 12 a 24 horas. Após este período retirar cuidadosamente a trouxa do copo, eliminar o sobrenadante e recuperar as larvas no sedimento (Thienpont *et al.*, 1986).

Placa de Petri

Após o período de incubação retirar o copo com a cultura fecal da estufa e adicionar água até preencher. Tapar o copo com uma placa de Petri e inverter o conjunto. Adicionar água à tampa da placa de Petri e aguardar de 12 a 24 horas. Após este período recuperar as larvas no sedimento presente na placa de Petri (Thienpont *et al.*, 1986).

Após a sua recolha, e independentemente do método adotado, as larvas devem ser transferidas para tubos de centrífuga e concentradas por sedimentação natural, durante 24 horas, ou por centrifugação a 1500rpm durante três minutos. Uma vez isoladas as larvas devem ser conservadas refrigeradas, à temperatura de 4 a 5°C, em tubos de centrífuga tapados com película aderente, de modo a reduzir a concentração de oxigénio e consequentemente o metabolismo das formas larvares. As larvas podem ser conservadas desta forma durante sete a 15 dias, embora permaneçam sem alterações durante três a quatro meses (Madeira de Carvalho, 2001; Madeira de Carvalho *et al.*, 2003, 2004).

7.3.1.5.3. Observação e identificação das larvas infetantes

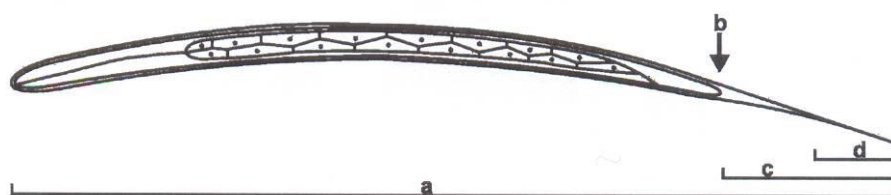
A observação das larvas deve ser realizada, sempre que possível, imediatamente após à colheita, de forma a permitir um estudo de exemplares sem alterações morfológicas (Zajac & Conboy, 2012). Para um estudo cuidadoso as larvas devem ser observadas entre lâmina e lamela após imobilização, fixação e coloração diferencial por imersão em solução iodada (Bussiéras & Chermette, 1991; Madeira de Carvalho 2001; Zajac & Conboy, 2012).

A identificação genérica e/ou específica das larvas do terceiro est  dio de desenvolvimento pode ser realizada por observação ao microscópio ótico com as objetivas de 10, 20 e 40 vezes (Madeira de Carvalho *et al.*, 2003). Estas larvas apresentam uma morfologia constante e característica do género ou da espécie a que pertencem, sendo o estudo dessa morfologia a base da sua identificação (Bussiéras & Chermette, 1991; Madeira de Carvalho 2001; Zajac & Conboy, 2012).

Consideram-se caracteres morfológicos úteis para identificação de larvas do terceiro est  dio de desenvolvimento, caracteres morfológicos externos e caracteres morfológicos internos. No

que respeita aos caracteres morfológicos externos, são avaliadas a bainha da larva, a cauda da larva, a cauda da bainha e a porção distal da cauda da bainha. Relativamente aos caracteres internos são avaliados aspetos relacionados com o aparelho digestivo como a morfologia da boca, o esófago, o intestino, o ânus e o poro anal, sendo ainda avaliada a célula primordial genital e a sua posição relativa aos restantes órgãos (Afonso-Roque, 1989 *in* Madeira de Carvalho, 2001; Wyk *et al.*, 2004). A forma, número e disposição das células intestinais são caracteres morfológicos de elevada utilidade para a identificação das larvas do terceiro estágio de desenvolvimento (Zajac & Conboy, 2012). A Figura 8 representa vários caracteres morfológicos considerados para a identificação de larvas infetantes L3.

Figura 8 - Diagrama da larva infetante (Adaptado de Wyk *et al.*, 2004).



a. comprimento total; b. cauda da larva; c. porção distal; d. filamento

A identificação das L3 de estrongilídeos dos asininos no presente trabalho foi realizada com base nos trabalhos e chaves propostas por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007, 2008, 2008a).

Segundo Madeira de Carvalho (2001), a percentagem de géneros e espécies, de cada amostra, pode ser estabelecida com base na contagem e identificação de pelo menos 100 larvas do terceiro estágio.

Durante o tempo de incubação na coprocultura podem sobreviver e proliferar, nas culturas fecais, nematodes não parasitas da ordem Rhabditida, que não devem ser confundidos com os nematodes parasitas (Bussiéras & Chermette, 1991). Os nematodes de vida livre, ou nematodes não parasitas, são facilmente identificados e diferenciados por possuir um es  fago r  bditiforme, com aparelho valvular muito desenvolvido e aparelho reprodutor nas formas adultas (Soulsby, 1986; Bussiéras & Chermette, 1991). As fêmeas adultas apresentam um útero com ovos no seu interior e os machos adultos apresentam espículas na cloaca, junto à extremidade posterior (Soulsby, 1986).

7.3.2. Contaminação por strongilídeos no ambiente

O desenvolvimento exógeno dos strongilídeos, parasitas de equídeos, inicia-se com a eliminação de ovos para o exterior juntamente com as fezes do hospedeiro e termina com a infecção do hospedeiro por ingestão de formas infetantes juntamente com o alimento (Soulsby, 1986; Romero, 1988; Eysker *et al.*, 2007).

Segundo Madeira de Carvalho (2001), as técnicas parasitológicas utilizadas no estudo da contaminação ambiental permitem avaliar a presença de ovos e assim como dos estádios larvares de vida livre presentes no alimento dos equídeos.

7.3.2.1. Estudo quantitativo da biodiversidade de larvas infetantes na pastagem

7.3.2.1.1. Amostragem de erva na pastagem

A amostragem de erva na pastagem deve ser realizada de forma a garantir a representatividade da área em estudo (Purvis, 1984). A pastagem deve ser percorrida, num trajeto em forma de W, em dois percursos inversos de forma que não se sobreponham as amostras (Purvis, 1984; Ludwig & Johnstone, 1984). Este método pressupõe dez paragens equidistantes entre si e em cada linha reta traçada, correspondendo a cada braço do W. Em cada paragem dever-se-á recolher cinco pequenas amostras de erva, correspondendo ao volume capaz de ser amostrado entre os dedos polegar e indicador do operador, retiradas à frente, à esquerda, à direita, à atrás e entre os pés do operador. Este procedimento, de 80 paragens e 400 colheitas de erva, permite colher entre 250 a 500 gramas de erva, correspondendo a uma amostra representativa da pastagem (Purvis, 1984; Ludwig & Johnstone, 1984; Madeira de Carvalho, 1993).

Segundo Soulsby (1986), a amostragem de erva na pastagem deverá ser realizada de manhã de forma a garantir os melhores resultados.

7.3.2.1.2. Conservação de erva na pastagem

Para interromper o desenvolvimento das formas parasitárias sem as inviabilizar, podendo ocorrer a retoma do seu desenvolvimento em laboratório, é necessário acondicionar a amostra sem ar, em recipiente hermético como o saco de plástico utilizado na recolha e refrigerar à

temperatura de 4 a 5°C (Bussiéras & Chermette, 1991; Taylor *et al.*, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

7.3.2.1.3. Extração das larvas infetantes

O processo de libertação das larvas infetantes de estrongilídeos da erva da pastagem é importante para a sua extração e posterior identificação. A imersão da amostra de erva da pastagem em água com detergente, durante algumas horas, facilita a libertação das larvas infetantes (Gettinby *et al.*, 1985; Madeira de Carvalho, 2001).

A adição de detergente na água de imersão reduz a tensão superficial, facilitando a libertação das larvas infetantes e permitindo melhores resultados (Gettinby *et al.*, 1985).

Segundo Madeira de Carvalho (2001), uma amostra, de 250 a 500 gramas de erva da pastagem, deve ficar imersa em dez litros de água corrente da torneira com adição de algumas gotas de detergente, durante cerca de 12 horas. Após este período a erva deve ser escorrida e centrifugada, de forma a recuperar-se o maior volume possível da água de lavagem. A erva é submetida a uma segunda lavagem para garantir a recuperação do maior número possível de larvas infetantes.

A  gua obtida nas duas lavagens   filtrada, para isolamento e concentração das larvas infetantes. Com recurso a um conjunto de filtros de malha decrescente, de 1000, 500, 250 e 20 micr metros (μm) de diâmetro,   possível eliminar os detritos de maiores dimensões, retidos nos filtros com poros de maior diâmetro, e concentrar e isolar as larvas infetantes, retidas no filtro de 20 μm de diâmetro. As larvas infetantes, e detritos finos, são transferidos para copos de precipitação de 250 ou 500 mililitros e, posteriormente, filtrados com papel de filtro onde ficam retidos   superfície (Madeira de Carvalho, 2001).

A recolha das larvas infetantes é realizada, mais frequentemente, pelos métodos que utilizam o aparelho de Baermann e o copo c nico (Thienpont *et al.*, 1986; Zajac & Conboy, 2012) e consiste na recuperação de dez mililitros da suspensão aquosa, que contem o sedimento acumulado nos métodos de recolha utilizados, e transferência para tubos de centrífuga com tampa para melhor conservação (Madeira de Carvalho, 2001).

A erva da pastagem, utilizada na extração das larvas infetantes, deve ser seca em estufa a 80 C durante dois a três dias e pesada de forma a determinar o peso da erva seca, em gramas, para posterior cáculo da concentração das larvas infetantes na pastagem e determinação do

número de L3 por grama de erva seca (Madeira de Carvalho, 2001; Madeira de Carvalho *et al.*, 2007).

7.3.2.1.3. Conservação e contagem das larvas infetantes

Segundo Madeira de Carvalho (2001), as larvas infetantes extraídas da erva das pastagens devem ser observadas imediatamente após a sua recolha. No entanto é possível conservá-las em suspensão aquosa, à temperatura de 4 a 5°C, num tubo de centrífuga, tapado com uma película de Parafilm® durante sete a 14 dias após colheita, sem que haja alteração morfológica evidente.

A contagem das larvas infetantes poderá ser realizada no sedimento de dez mililitros de suspensão aquosa, após centrifugação a 2500rpm durante cinco minutos. Caso exista uma concentração baixa de larvas, a totalidade das larvas presentes corresponderão ao total de larvas presentes na amostra de erva colhida. Se o número de larvas infetantes for muito elevado poder-se-á proceder à homogeneização da suspensão aquosa e recuperar apenas um mililitro. Deve ser contada a totalidade das larvas infetantes presentes nesta alíquota e o número obtido multiplicado por dez para cálculo do total de larvas presentes na amostra de erva colhida. Se, ainda assim, a concentração de larvas infetantes for muito elevada poder-se-á proceder à sua diluição ou à colheita de alíquotas de menor volume (Madeira de Carvalho, 2001).

Este volume deverá ser observado ao microscópio ótico, com ampliações baixas de 40 a 200 vezes, adicionando duas a três gotas de soluto de lugol para permitir uma identificação mais correta das larvas infetantes (Thienpont *et al.*, 1986; Madeira de Carvalho, 2001; Zajac & Conboy, 2012).

O valor da concentração de larvas infetantes na erva da pastagem é expresso pelo número de larvas infetantes presentes num quilograma de erva seca e calculado através da fórmula $N^{\circ}L3/Kg\ ES = [N^{\circ}\text{ total de L3 (10ml)} \times 1000] / \text{Peso de erva seca em gramas}$ (Madeira de Carvalho, 2001; Madeira de Carvalho *et al.*, 2007).

7.3.2.2. Estudo quantitativo da contaminação dos estábulos

A contaminação do meio ambiente, e permanência de ovos e larvas de parasitas no estábulo, pode constituir um importante fator de risco para a infecção dos equídeos estabulados (Uhlinger, 1991; Madeira de Carvalho, 2001; Döpfer *et al.*, 2004).

7.3.2.2.1. Método de amostragem e colheita

A amostragem das camas do estábulo e do alimento das manjedouras deverá ser metódica e sistemática de forma a permitir a recolha de uma amostra representativa (Purvis, 1984; Fazendeiro, 1989). A palha deve ser colhida em diversos pontos das camas, em camadas mais superficiais e profundas, e em várias localizações do estábulo (Madeira de Carvalho, 2001). Segundo Fazendeiro (1989), para que não haja sobreposição, as amostras devem ser colhidas em cinco zonas diferentes da cama.

Segundo Madeira de Carvalho (2001), o procedimento de amostragem do alimento, palha ou feno da manjedoura, realiza-se de forma idêntica ao da cama do estábulo.

7.3.2.2.2. Determinação do nível de contaminação das camas e da alimentação

Fazendeiro (1989) refere uma modificação da técnica de McMaster adaptada às amostras da cama ou alimento de animais estabulados. Segundo a autora, a suspensão de seis gramas de palha ou feno, em 54 mililitros de solução saturada de açúcar permite uma sensibilidade de 20 ovos por grama de conteúdo da cama ou alimento.

III. TRABALHO EXPERIMENTAL

Estudo epidemiológico do parasitismo por strongilídeos em asininos da Raça de Miranda

1. INTRODUÇÃO

Os asininos (*Equus asinus*) da Raça de Miranda, são criados em explorações tradicionais de minifúndio do tipo familiar, do Planalto Mirandês e Parque Natural do Douro Internacional. Estes animais encontram-se frequentemente estabulados em comunidade com os restantes animais domésticos como bovinos, ovinos e galináceos, sendo utilizados nas principais atividades agropecuárias tradicionais. Esta população de asininos encontra-se também associada a múltiplos projetos de recuperação da Raça Asinina de Miranda, desenvolvidos pela Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino (AEPGA). Sendo frequente a utilização destes animais em atividades lúdicas e de lazer relacionadas com a preservação dos recursos ecológicos, culturais e sociais dos concelhos de Bragança, Miranda do Douro, Vimioso e Mogadouro.

A problemática do desaparecimento dos asininos em Portugal tem vindo a despertar, nos últimos anos, o interesse pelo estudo do seu parasitismo no entanto, são raros os estudos parasitológicos em asininos, não se conhecendo a importância clínica e epidemiológica das parasitoses intestinais por strongilídeos nestes hospedeiros. Entre 2005 e 2008, período anterior à data do início deste trabalho, foram realizados estudos parasitológicos que revelaram a ocorrência de um parasitismo caracterizado por cargas parasitárias e biodiversidade elevadas, associado a um potencial patogénico elevado nos asininos criados em explorações tradicionais do Planalto Mirandês. Em julho de 2005, o primeiro estudo parasitológico realizado neste grupo de animais revelou uma prevalência de infeção por strongilídeos intestinais de 87,0% (110/127) em que 70,9% dos asininos parasitados eliminavam valores superiores a 1000 OPG, dos quais 14,5% intensamente parasitados eliminavam valores superiores a 5000 OPG. Durante os anos de 2006 a 2008 foi realizado o controlo antiparasitário estratégico com administração regular e periódica de ivermectina a 2% (1ml/50Kg PV), duas vezes por ano durante as estações de outono e primavera. Em fevereiro de 2008 foi observada uma prevalência de infeção de apenas 38,8% (33/85) em que 81,8% dos asininos parasitados apresentaram eliminação inferior a 1000 OPG, e apenas 18,2% apresentaram uma eliminação superior a 1000 e inferior a 2500 OPG (Sousa *et al.*, 2008).

Estudos revelaram prevalências de infecções por *estrongilídeos* intestinais em cerca de 38% dos asininos sujeitos a controlo antiparasitário estratégico centrado na administração semestral de ivermectina ao longo de quatro anos, entre 2005 e 2008, evidenciando uma diminuição da biodiversidade parasitária associada a um aumento da prevalência de infecção por *ciatostomíneos*, de 85,2% para 100% (Sousa & Madeira de Carvalho, 2009) assim como em outros locais do país (Gomes *et al.*, 2006, 2007) e um pouco por todo o mundo (Tsegaye & Chala, 2015; Sheferaw & Alemu, 2015).

Considerando o estatuto parasitológico dos animais da Raça Asinina de Miranda, observado até 2008, e tendo em conta o efeito negativo que o parasitismo por *estrongilídeos* pode exercer na saúde e bem-estar, assim como na sua capacidade reprodutora, foi proposta a realização deste trabalho que pretendeu observar a infecção parasitária natural deste núcleo de animais tão importantes no desenvolvimento de programas de recuperação e reprodução da Raça de Miranda, no solar da raça. Assim, com este trabalho pretende-se observar o estatuto parasitológico dos animais da Raça Asinina de Miranda de forma a contribuir para um melhor conhecimento do parasitismo intestinal envolvido, em particular os *estrongilídeos*, e da adoção de medidas terapêuticas adequadas, contribuindo para o desenvolvimento de programas de recuperação da única raça asinina autóctone registada e reconhecida em Portugal.

2. OBJETIVOS

Com o objetivo global de avaliar a dinâmica do parasitismo por *estrongilídeos* gastrintestinais de asininos da Raça de Miranda no Planalto Mirandês sujeitos a um controlo anti-helmíntico seletivo, os objetivos deste trabalho consistiram em:

1. Elaborar inquéritos epidemiológicos com a finalidade de caracterizar a população hospedeira em estudo, assim como a exploração agropecuária envolvida.
2. Alterar o controlo anti-helmíntico estratégico para controlo anti-helmíntico seletivo.
3. Avaliar o parasitismo por *estrongilídeos* parasitas gastrointestinais de asininos:
 - 3.1. Determinar a taxa de prevalência de infecção parasitária.
 - 3.2. Determinar o nível de infecção parasitária dos animais.
 - 3.2. Avaliar a biodiversidade parasitária.
4. Estudar a contaminação ambiental por *estrongilídeos*:
 - 4.1. Prevalência e biodiversidade de larvas infetantes de *estrongilídeos* na pastagem.
 - 4.2. Abundância de *estrongilídeos* na palha e alimento do estábulo.

3. DESENHO EXPERIMENTAL

O período de realização deste estudo decorreu entre dezembro de 2009 e setembro de 2014. Foi realizado um estudo observacional longitudinal que decorreu de acordo com a calendarização esquematizada na Figura 9. Ao longo de 60 meses, com intervalos trimestrais, foi realizada a colheita de material biológico e efetuado o respetivo processamento laboratorial. No final de cada ano procedeu-se à compilação de dados, análise e discussão dos resultados.

Figura 9 - Calendarização do trabalho experimental (período de tempo dividido em três meses).

	2009			2010			2011			2012			2013			2014		
Inquéritos epidemiológicos																		
Estrongilídeos intestinais																		
Estrongilídeos no ambiente																		
Compilação e análise de dados																		

4. MATERIAL E MÉTODOS

De forma a concretizar os objetivos propostos, foi necessário recorrer a diversas fontes de informação.

O Quadro 5 apresenta as fontes de informação utilizadas para a realização do estudo assim como os métodos utilizados na sua recolha.

Quadro 5 - Fontes de dados, métodos de recolha e de registo.

Fontes de dados	Método de recolha	Registo dos dados
AEPGA	Questionário	Inquérito (Anexo I) Base de dados Microsoft Office - Excel
AEPGA (animais)	Amostras biológicas	Processo Individual Base de dados Microsoft Office - Excel
IPMA	Dados meteorológicos	Base de dados Microsoft Office - Excel

Considerou-se como a população alvo do estudo, os asininos da Raça de Miranda residentes nos centros de recuperação da raça da Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino (AEPGA). A realização dos inquéritos visou a caracterização da população estudada. Além disso, ao longo do período de estudo, e com uma periodicidade de trimestral, foram colhidas amostras biológicas individuais que após transportadas para o laboratório foram processadas de forma a permitir a concretização dos objetivos estipulados para o presente estudo.

4.1. Inquéritos epidemiológicos

Os inquéritos epidemiológicos permitiram a obtenção de informação relativa à população estudada assim como informação relativa aos fatores de maior suscetibilidade dos asininos para o parasitismo intestinal por *estrongilídeos* (Anexo I).

Estes inquéritos, realizados no início do estudo, foram anexados ao processo individual de cada animal. Algumas das informações individuais registadas foram sexo, idade, condição corporal e perímetro torácico. Relativamente à condição corporal, os animais foram classificados de acordo com a escala de índice de condição corporal (ICC), entre 1 a 5, referida por Smith & Wood (2008). Para a análise dos resultados foram considerados três grupos de acordo com o índice de condição corporal: 2-2,5; 3-3,5 e 4-5.

O perímetro torácico (PTO) permite estimar a altura e o peso dos animais (Smith & Wood, 2008). O seu registo para cada uma dos animais foi efetuado em centímetros e, para a análise dos resultados, consideraram-se três grupos: 115-128; 130-149 e 150-168.

Além de informações individuais, os inquéritos também visaram a recolha de informação sobre a exploração, o manejo sanitário e sistema de criação dos Burros de Miranda, com a finalidade de caracterizar não só a unidade epidemiológica animal como também a unidade epidemiológica exploração.

Acrescenta-se ainda que foram registadas outras informações relevantes para a caracterização da área de estudo, nomeadamente as condições climáticas da região durante o período de estudo. Assim, segundo os registos do Boletim Climatológico Mensal de Portugal Continental, publicado pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), foi possível acompanhar e registar os dados meteorológicos da estação meteorológica de Bragança, localizada a 41°49'N; 6°46'O.

4.1.1. Caracterização da área de estudo

A população de asininos encontrava-se sedada em três centros de recuperação da Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino (AEPGA), localizados nas aldeias de Atenor (41°42'N, 06°48'O, a 652 metros de altitude), Duas Igrejas (41°47'N, 06°35'O, a 738 metros de altitude) e Pena Branca (41°54'N; 06°26'O, a 741 metros de altitude). Durante o período de estudo, grande parte desta população de asininos, residente nos centros da AEPGA, foi utilizada em atividades relacionadas com a preservação da Raça Asinina de Miranda. Estas atividades foram realizadas no Planalto Mirandês, localizado entre os paralelos 41°08'N e 41°47'N e pelos meridianos de 06°10'O e 06°54'O, e descrito no capítulo de Materiais e Métodos Gerais (Capítulo 3).

Caracterização dos centros de recuperação da AEPGA

A AEPGA possui três centros, criados para acolher os asininos pertencentes à Associação, vocacionados para atividades específicas com o objetivo de cuidar e preservar o gado asinino, em particular a raça autóctone de asininos da Terra de Miranda.

O *Centro de Acolhimento e Recuperação do Burro* foi criado em 2004 com o objetivo social de acolher asininos que deixavam de ter utilidade no trabalho agrícola e perdiam funcionalidade no meio rural onde viviam. Estes animais idosos, doentes e sem mercado, eram frequentemente negligenciados e alvo de abandono e maus tratos por parte dos seus proprietários, muitas vezes eles próprios idosos e doentes, sem condições para cuidar dos animais. Assim, neste centro a AEPGA fornece cuidados veterinários adequados, de forma a melhorar o bem-estar e saúde animal, com o objetivo de recuperar alguma funcionalidade destes animais e de os utilizar em atividades lúdicas e pedagógicas, em benefício para o animal assim como para a comunidade em geral.

O *Centro de Acolhimento e Recuperação do Burro*, localizado na aldeia de Duas Igrejas, consiste num retiro para burros constituído por um palheiro, onde se armazena o alimento como palha e feno, uma loja onde os animais se abrigam durante a noite e de intempéries, e de um lameiro com aproximadamente dois hectares de área.

Figura 10 - Animais da Raça Asinina de Miranda em lameiro de um centro de recuperação da AEPGA (Fonte: AEPGA).



O *Centro de Pena Branca* está sediado numa antiga escola primária da aldeia de Pena Branca, onde é possível acolher algumas atividades e encontros de formação técnico-científica como *workshops* e palestras. Este centro é constituído por um lameiro com aproximadamente um hectare onde se encontra um palheiro, para armazenar o alimento, e as lojas para abrigar os asininos. Este centro da AEPGA abriga uma comunidade de animais adultos, da Raça Asinina de Miranda e de raça indeterminada, que vivem em comunidade e são utilizados em atividades agrícolas locais, em atividades lúdicas e de lazer, e em sessões de asinoterapia, com vista a melhorar a qualidade de vida das pessoas da região e a preservar os recursos locais.

O *Palheirico* foi criado pela AEPGA com o objetivo de ser o centro de reprodução e recria da raça Asinina de Miranda. Sediado na aldeia de Atenor, este centro consiste num espaço com uma área total de sete hectares, que contempla um lameiro de pasto com cerca de 1 hectare, um palheiro onde são guardados os fardos de palha e feno para a alimentação dos animais e lojas onde os animais ficam abrigados durante a noite. Neste centro existem apenas animais da Raça Asinina de Miranda utilizados em projetos de melhoramento genético, reprodução e criação da raça autóctone. Estes animais, fêmeas e machos reprodutores assim como jovens

em recria e alguns machos castrados, são frequentemente utilizados em atividades lúdicas e de lazer relacionadas com a preservação dos recursos ecológicos, culturais e sociais locais.

Sistema de criação e manejo

Nos centros de recuperação, os animais permaneceram em regime de semi-estabulação com acesso permanente à pastagem e alimentados com palha, feno ou ração duas vezes por dia, no início da manhã e fim da tarde. O acesso à água fresca foi permanente, durante todo o dia, com recurso a bebedouro de água potável junto à pastagem.

Ao longo do período de estudo observou-se uma grande mobilidade dos animais entre os três centros da AEPGA, com transferências frequentes de animais adultos entre os centros de Atenor e Pena Branca, assim como substituições de animais seniores no centro de Duas Igrejas. Foram ainda observadas deslocções dos animais adultos para o exterior dos centros, participando em múltiplas atividades associadas a projetos da AEPGA. Nessas atividades os asininos partilhavam espaços e pastagens com outros equídeos (asininos, equinos e muares), ruminantes (bovinos e ovinos) e restantes animais domésticos provenientes de explorações agropecuárias tradicionais de particulares.

4.2. Alteração do controlo anti-helmíntico estratégico para controlo anti-helmíntico seletivo

Este objetivo baseou-se em duas observações relativamente ao parasitismo deste grupo de animais e previamente referidas no item 4.1.: a) resultados de estudos realizados em asininos, criados em explorações tradicionais do Planalto Mirandês, sujeitos a administrações semestrais de ivermectina ao longo de quatro anos, entre 2005 e 2008 (Sousa *et al.*, 2008); b) a prevalência de infeção de 38,0% associada à diminuição da biodiversidade de estrongilídeos intestinais e aumento da prevalência de infeção por ciatostomíneos para 100% (Sousa & Madeira de Carvalho, 2009).

Tendo em conta que a abordagem tradicional de controlo anti-helmíntico estratégico, baseada em tratamentos frequentes, de grupo, com administrações de anti-helmínticos em intervalos regulares, contribuiu para o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica, em particular nos ciatostomíneos (Nielsen, 2009), foi considerada uma nova abordagem de controlo parasitário para esta população de asininos.

Assim, em dezembro de 2009, foi proposta à AEPGA a alteração da estratégia de controlo

anti-helmíntico. Desta forma, a partir desta altura o controlo anti-helmíntico passou a ser efetuado de forma seletiva, apenas em animais identificados como parasitados e eliminadores de elevada carga parasitária. Considerou-se o tratamento dos animais eliminadores de valores iguais ou superiores a 500 OPG, estabelecendo-se assim este como o valor limiar para tratamento considerado neste trabalho.

A monitoração periódica dos asininos, realizando diagnósticos coprológicos quantitativos individuais, de três em três meses, permitiu o controlo seletivo da população estudada.

4.3. Estudo do parasitismo por estrongilídeos parasitas intestinais de asininos

4.3.1. Amostragem e colheita de fezes

Durante o estudo, foram colhidas amostras fecais a todos os asininos da Raça de Miranda residentes nos centros de recuperação. A colheita individual de fezes foi realizada por palpação rectal e consistiu na recolha de aproximadamente 500 gramas de fezes a partir da ampola rectal com luva obstétrica, utilizando lubrificante (Vetopgel®) para facilitar a recolha e minimizar o desconforto do animal. O material fecal colhido e identificado, como esquematizado na Figura 11, foi acondicionado em malas térmicas à temperatura de 4-5°C, transportado para o laboratório e mantido à temperatura de refrigeração até ao seu processamento.

Figura 11 - Colheita individual de fezes por palpação rectal (Original).



1 - Lubrificação da luva de palpação rectal. 2 - Colheita da amostra fecal da ampola rectal por palpação rectal. 3 - Amostra fecal com aproximadamente 500 gramas. 4 - Identificação do material fecal colhido.

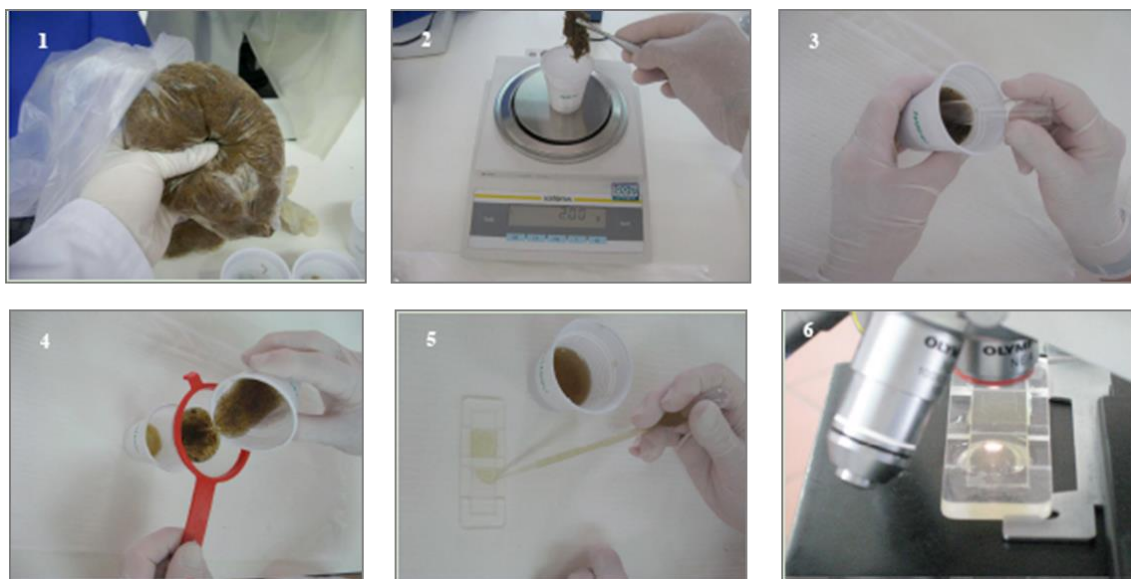
4.3.2. Determinar a taxa de prevalência de infecção parasitária

A metodologia utilizada para determinar a taxa de prevalência de infecção parasitária consistiu na identificação e na contagem de ovos tipo *strongilídeo* por coprologia quantitativa, de acordo com o método de McMaster modificado por Thienpont *et al.* (1986) e referido por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b), cujo protocolo se encontra referido no Anexo II. A identificação de casos de parasitismo por *strongilídeos* gastrintestinais permitiu determinar a taxa de prevalência de infecção parasitária.

Coprologia quantitativa

A técnica consistiu em diluir duas gramas de fezes de asinino em 28 mililitros de solução saturada de açúcar simples com densidade de 1.20. Após homogeneização a suspensão fecal foi filtrada e transferida para uma câmara de McMaster, como se encontra esquematizado na Figura 12.

Figura 12 - Método de McMaster modificado referido por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b) (Original).



1 - Homogeneização da amostra fecal. 2 - Pesagem de 2 grama de fezes. 3 - Suspensão fecal em solução densa de açúcar. 4 - Filtragem. 5 - Transferência para a câmara de contagem McMaster. 6 - Observação ao microscópio ótico com baixas ampliações.

O diagnóstico de parasitismo, foi realizado pela observação de um ou mais ovos do tipo estrongilídeo, com a ampliação 100 e 200 vezes. Os ovos observados foram designados por ovos do tipo estrongilídeo ou apenas ovos de estrongilídeos por apresentarem morfologia geral da família Strongylidae (Figura 13).

A contagem dos ovos de estrongilídeo foi efectuada nas duas células de contagem da câmara de McMaster e o valor de OPG foi determinado multiplicando o fator de correção 50 ao número de ovos contados.

O resultado foi considerado negativo quando não se observavam ovos de estrongilídeo na amostra, apresentando assim valores inferiores a 50 OPG. A presença de pelo menos um ovo de estrongilídeo determinava o resultado positivo da amostra, apresentando assim um resultado sempre igual ou superior a 50 OPG.

Considerando que algumas amostras negativas, com valores abaixo dos 50 OPG, pudessem estar parasitadas, determinou-se que todas as amostras fecais negativas (<50 OPG) e positivas (≥ 50 OPG) fossem sujeitas à coprocultura, descrita no item 3.3.1.5. e no Anexo III, para estudo da biodiversidade parasitária.

Figura 13 - Ovo do tipo estrongilídeo observado ao microscópio ótico. Imagem ampliada 192 vezes (Original).



4.3.3. Determinar o nível de infecção parasitária dos animais

A metodologia usada para determinar o nível de infecção parasitária (NIP) consistiu na contagem de ovos tipo estrongilídeo por coprologia quantitativa, de acordo com o método de McMaster modificado por Thienpont *et al.* (1986) e referido por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b), cujo protocolo se encontra referido no Anexo II e no item 4.4.3.2. Coprologia Quantitativa. A determinação do número de ovos por grama de fezes (OPG) permitiu avaliar o nível de infecção parasitária (NIP).

De acordo com o valor de OPG os níveis de infecção parasitária (NIP) foram categorizados em fraco, médio e forte, quando observados respetivamente, entre 50 a 450 OPG, entre 500 a 1000 OPG, e valores superiores a 1000 OPG.

4.3.4. Avaliar a biodiversidade parasitária

A identificação dos diferentes géneros e espécies de parasitas estrongilídeos dos equídeos é indispensável para o estudo da sua biologia e patogenia (Madeira de Carvalho, 2001). Segundo Bevilaqua *et al.* (1993), a observação e identificação das larvas infetantes é a melhor forma de diferenciar estes parasitas, visto que a morfologia dos seus ovos é muito idêntica.

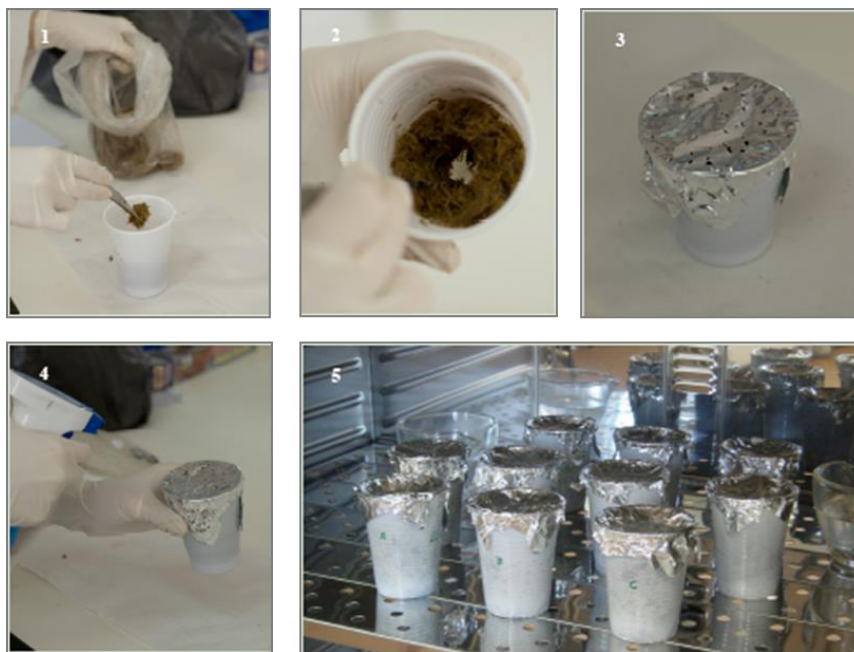
A biodiversidade de estrongilídeos parasitas gastrintestinais foi avaliada através da realização de culturas fecais. A partir de todas as amostras fecais colhidas procedeu-se à obtenção de larvas infetantes do terceiro estágio de desenvolvimento por coprocultura.

Culturas fecais ou coproculturas

As culturas fecais foram realizadas de acordo com o método de Roberts & O'Sullivan (1950) modificado por Ueno & Gutierrez (1983) e Madeira de Carvalho (1991, 1993) e referido por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007b, 2008). O protocolo utilizado neste estudo encontra-se no Anexo III.

A técnica de cultura fecal consistiu em colocar cerca de 50 a 60 gramas de fezes humedecidas e homogeneizadas em recipiente de plástico descartável. As culturas foram cobertas com papel de alumínio perfurado e incubadas durante 14 dias, em estufa à temperatura de 26 a 28°C e humidade relativa de 70 a 80%. A técnica utilizada encontra-se esquematizada na Figura 14.

Figura 14 - Método de cultura fecal referido por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007, 2008) (Original).



1 - Transferência de fezes para o copo de plástico descartável. 2 - Orifício em profundidade no centro da amostra homogeneizada. 3 - Copo coberto com folha de alumínio perfurada. 4 - Humedecimento da amostra. 5 - Incubação em estufa húmida.

Recolha de larvas infetantes

A recolha das larvas infetantes foi realizada pelo método de Roberts & O'Sullivan (1950) modificado por Euzéby (1982), referido por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007, 2008). O protocolo utilizado encontra-se no Anexo IV.

Esta técnica foi realizada após o período de 14 dias de incubação e consistiu em submergir a cultura fecal em água e invertê-la sobre uma placa de Petri à qual se adicionou 20 mililitros de

água. Após um repouso de 24 horas o líquido presente na placa de Petri, foi recolhido e transferido para tubos de centrífuga de dez mililitros. A concentração das L3 ocorreu por centrifugação a 1500rpm durante três minutos.

A conservação ocorreu por refrigeração a 4-5°C, em tubos de centrífuga cobertos com película de “Parafilm®”, durante um período inferior a 15 dias.

Identificação das larvas infetantes

Com o propósito de realizar o estudo morfológico das L3 e de forma a assegurar um bom estado de conservação, foi realizada a observação e identificação larvar nos 15 dias seguintes à recolha.

A observação microscópica ocorreu em preparação lâmina-lamela, com as L3 fixadas e coradas com soluto de lugol, de acordo com protocolo referido no Anexo V.

A identificação microscópica das larvas infetantes foi realizada, utilizando ampliações de 40, 100 e 200 vezes e considerando caracteres morfológicos de identificação referidos na chave dicotómica proposta por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007b, 2008), como as larvas infetantes de *Cyathostomum sensu lato* referidas na Figura 15.

Figura 15 - Larvas infetantes (L3) de *Cyathostomum sensu lato* morfotipo A (esquerda) e morfotipo D (direita). Observação ao microscópio ótico, imagem ampliada 100 vezes (original).



A chave para identificação de nematodes comuns dos equídeos encontra-se referida no Anexo VI. Em particular as L3 de *Cyathostomum sensu lato* que segundo Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007b, 2008), agrupam larvas infetantes que

apresentam entre seis e nove células intestinais, sendo distribuídos por oito morfotipos diferentes, de A a H, como referido no Quadro 6.

Quadro 6 - Tipos larvares, número e disposição de células intestinais do género *Cyathostomum sensu lato* (segundo Madeira de Carvalho, 2001 e Madeira de Carvalho *et al.* 2004, 2007b, 2008).

Tipo larvar	Nº células intestinais	Arranjo das células intestinais
<i>Cyathostomum</i> spp. Tipo A	8	2+6
<i>Cyathostomum</i> spp. Tipo B	8	4+4
<i>Cyathostomum</i> spp. Tipo C	8	2+2+4
<i>Cyathostomum</i> spp. Tipo D	8	Fila única
<i>Cyathostomum</i> spp. Tipo E	6	Variável
<i>Cyathostomum</i> spp. Tipo F	7	Variável
<i>Cyathostomum</i> spp. Tipo G	8	Variável
<i>Cyathostomum</i> spp. Tipo H	9	Variável

4.4. Estudo da contaminação ambiental por strongilídeos

O estudo de contaminação ambiental por strongilídeos foi realizado ao nível da pastagem e ao nível do estábulo.

4.4.1. Estudo da biodiversidade de larvas infetantes de strongilídeos na pastagem

Para o estudo da população de larvas infetantes de strongilídeos procedeu-se à amostragem de erva na pastagem assim como a extração das larvas infetantes.

Amostragem

A amostragem da erva da pastagem foi realizada de acordo a técnica do duplo W desenvolvida por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b). De acordo com o protocolo, referido no Anexo VII, foram realizadas cinco colheitas de erva em 80 pontos da pastagem, totalizando 400 colheitas com um peso de 250 a 500 gramas. As amostras foram conservadas refrigeradas, a 4-5°C, acondicionadas em sacos de plástico até ao processamento laboratorial.

Extração

Para a extração das larvas infetantes da erva da pastagem procedeu-se de acordo com a técnica de Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b), cujo procedimento se encontra no Anexo VIII. A metodologia, representada na Figura 16, consistiu em dois ciclos de lavagens da amostra de erva da pastagem, o primeiro ciclo realizado com imersão da erva em água da torneira com detergente para facilitar a libertação e posterior recuperação das larvas infetantes (L3). Procedeu-se à centrifugação da amostra de erva lavada para recuperar a água de lavagem que foi filtrada, por um sistema de malhas com diâmetro decrescente (dois filtros de malha com diâmetro de 1000, dois filtros de 500, dois filtros de 106 e um filtro de malha com 20 micrómetros), para concentrar as larvas infetantes e permitir a sua extração.

A recolha das larvas infetantes foi realizada pelo método do copo cónico mediante recuperação de dez mililitros do sedimento acumulado em 24 horas e transferência para tubos de centrífuga com tampa. A conservação foi realizada por refrigeração, à temperatura de 4-5°C, durante sete a 14 dias após extração.

Figura 16 - Extração das larvas infetantes da erva da pastagem segundo metodologia referida por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b) (Original).

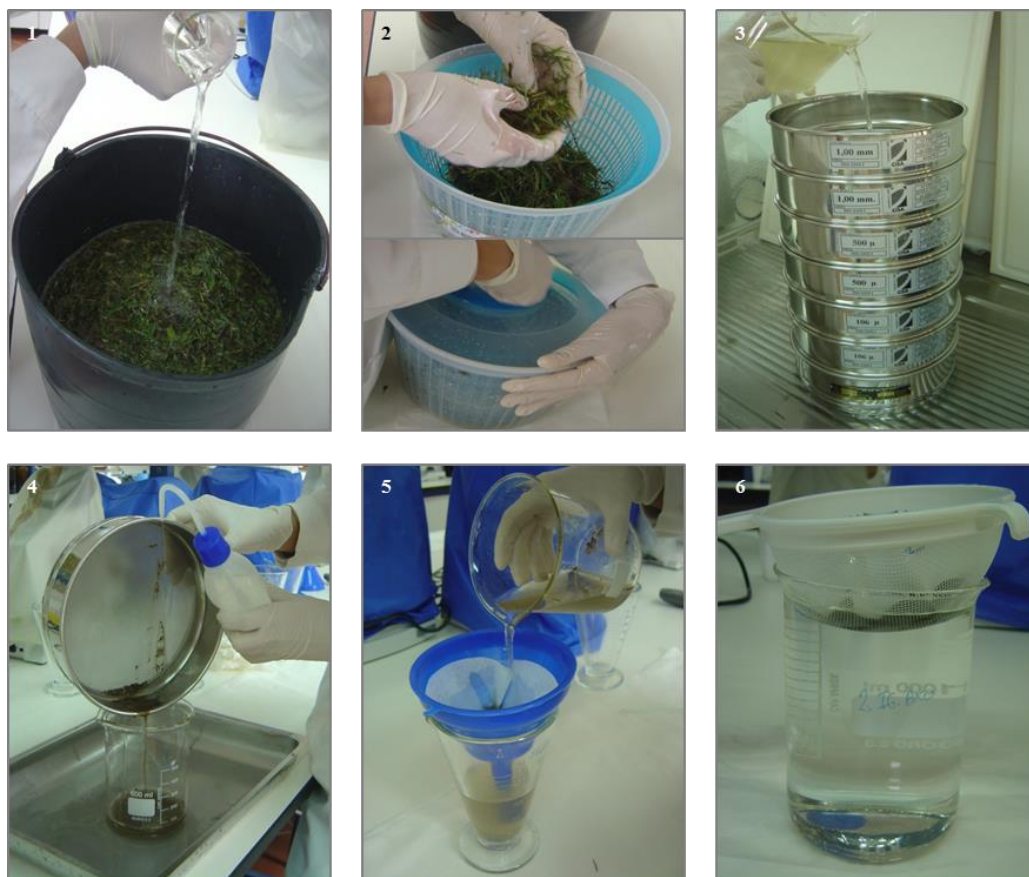


Figura 16 (continuação). Legenda:

1 - Lavagem com imersão da erva da pastagem. 2 - Centrifugação. 3 - Filtração da água de lavagem da erva da pastagem. 4 - Recuperação do sedimento retido no filtro de 20µm. 5 - Concentração das larvas infetantes transferindo-as para papel de filtro. 6 - Extração das larvas infetantes dos sedimentos finos.

Identificação

A identificação das larvas infetantes presentes na erva da pastagem foi realizada segundo a chave para identificação de nematodes referida no Anexo VI, e a contagem foi realizada segundo metodologia referida por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b), exposta no Anexo IX. A técnica consistiu na contagem da totalidade de larvas infetantes existentes nos dez mililitros de suspensão aquosa do sedimento colhido.

Quantificação

A erva da pastagem, utilizada na extração das larvas infetantes, foi seca em estufa a 80°C durante três dias, e pesada imediatamente após o período de secagem para se obter o peso de erva seca (ES) em grama, utilizado no cálculo do valor da concentração de larvas infetantes na erva da pastagem.

O número de larvas infetantes por quilograma de erva seca foi calculado através da fórmula $N^{\circ}L3/Kg\ ES = [N^{\circ}\text{ total } L3\ (10ml) \times 1000] / \text{Peso de erva seca em gramas}.$

4.4.2. Estudo da contaminação do estábulo

Para o estudo da contaminação do estábulo por estrongilídeos procedeu-se à amostragem e colheita de palha das camas assim como da palha e feno utilizados na alimentação.

Amostragem

A técnica consistiu em colher amostras, de palha da cama e palha ou feno das manjedouras, em camadas mais superficiais e profundas de várias localizações do estábulo. O procedimento utilizado para a amostragem do estábulo foi descrito por Madeira de Carvalho (2001) e encontra-se referido no Anexo X.

Técnica parasitológica quantitativa para amostras ambientais

O estudo do nível de contaminação da cama e do alimento foi realizado pela técnica de McMaster referida por Madeira de Carvalho (2001) e descrita no Anexo XI. Esta técnica de McMaster modificada, esquematizada na Figura 17, consistiu em suspender seis gramas de palha ou feno em 54 mililitros de solução saturada de açúcar e, procedendo de acordo com o descrito no Anexo II, considerou-se negativa a amostra com valores inferiores a 20 OPG e positivas a com valores iguais ou superiores a 20 OPG.

Figura 17 - Técnica de McMaster modificada para recuperar ovos de estrongilídeos da palha da cama e feno da manjedoura referida por Madeira de Carvalho (2001) (Original).



1 - Cortar a amostra em aparas com tesoura e pesar 6 grama. 2 - Suspender em solução densa de açúcar. 3 - Filtragem. 4 - Transferência para a câmara de contagem McMaster.

5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

O tratamento estatístico considerou variáveis de caracterização da população como sexo (categorial nominal: fêmea, macho castrado, macho inteiro), idade (contínua), condição corporal (categorial nominal: 2-2,5; 3-3,5; 4-5) e perímetro torácico (categorial nominal: 115-128; 130-149 e 150-168). Foram também consideradas variáveis de caracterização climática como a temperatura média (contínua), temperatura mínima (contínua), temperatura máxima (contínua) e precipitação (contínua). As variáveis de resposta foram resultados da coprologia quantitativa (categorial nominal: positivo/negativo), número OPG (contínua), NIP (categorial nominal: fraco, médio, forte) e número de larvas infetantes (contínua).

Os dados foram analisados através do programa estatístico “R” (versão 3.2.2: <https://www.r-project.org>). O teste de Spearman foi utilizado para analisar correlações entre variáveis através da determinação do coeficiente ρ (rho). Foi também utilizado o teste ANOVA para estudar a variabilidade dos dados entre dois ou mais grupos, comparando as suas médias.

6. RESULTADOS

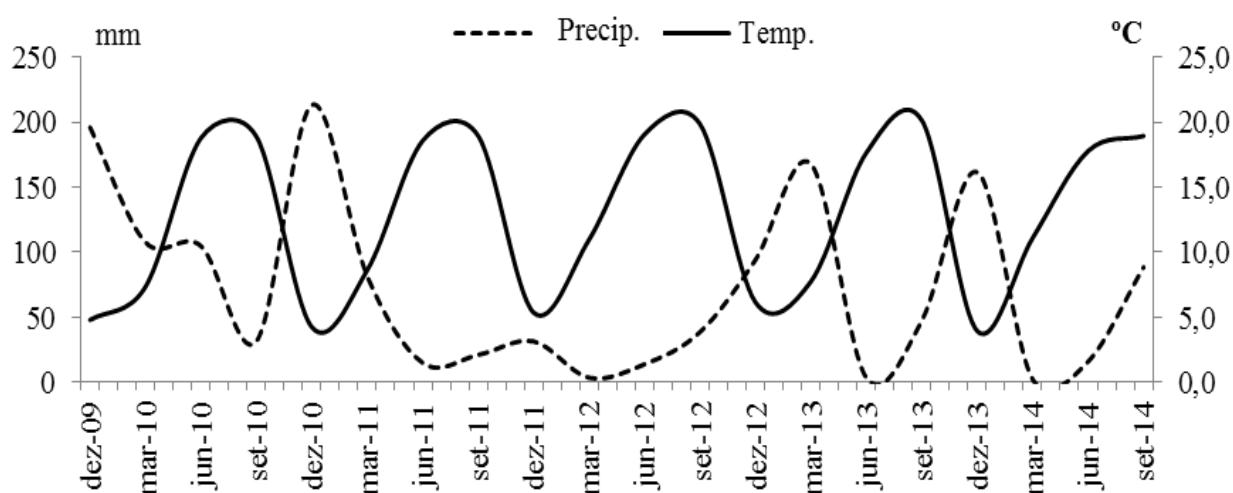
6.1. Caracterização climática do período de estudo

A caracterização climática da região em estudo foi realizada com base nos registos da estação meteorológica de Bragança (41°49'N; 6°46'O), por ser a estação mais próxima do local de estudo com registos regulares durante o período de estudo, de dezembro de 2009 a setembro de 2014. Apesar da existência de uma estação udométrica com localização mais próxima ao local de estudo, em Miranda do Douro (41°30'N; 06°17'O), não foi possível utilizar os seus registos por falta de dados durante o período de estudo.

Segundo os registos do Boletim Climatológico Mensal de Portugal Continental, do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, foi possível acompanhar os dados meteorológicos, apresentados no Gráfico 1 e resumidos no Quadro 7.

Durante os cinco anos de estudo registaram-se 401 dias com temperaturas iguais ou superiores a 25°C, dos quais 284 (70,8%) apresentaram valores iguais ou superiores a 30°C. Observou-se ainda que 68,3% (194/284) dos dias mais quentes ocorreram nos meses de julho (60/194) e agosto (134/194), sendo estes os meses mais quentes com média de temperatura máxima de 30,1 e 30°C, respetivamente.

Gráfico 1 - Diagrama pluviométrico com valores da precipitação média mensal (mm) e temperatura média mensal (°C), registados entre dezembro de 2009 e setembro de 2014.



Quadro 7 - Resumo dos parâmetros e valores registados na estação meteorológica de Bragança entre dezembro 2009 e setembro de 2014 (Fonte: IPMA).

Parâmetros meteorológicos	
Temperatura média anual	12,9°C
Temperatura média do mês mais quente	22,0°C
Temperatura média do mês mais frio	4,9°C
Temperatura máxima absoluta	37,2°C
Temperatura mínima absoluta	-9,2°C
Nº de dias com temperatura $\geq 25^{\circ}\text{C}$	401
Nº de dias com temperatura $\geq 30^{\circ}\text{C}$	284
Nº de dias com temperatura $\leq 0,0^{\circ}\text{C}$	93
Precipitação média anual	72,1mm
Precipitação média do mês mais chuvoso	139,3mm
Precipitação média do mês mais seco	14,6mm
Nº de dias com precipitação $\geq 1 \text{ mm}$	172

Os meses de dezembro, janeiro e fevereiro foram os mais frios, com temperaturas médias de 4,9°C, 5,1°C e 5,4°C, respetivamente. No entanto foi em fevereiro que se registou o maior número de dias com temperaturas iguais ou inferiores a 0,0°C, correspondendo a 59,5% (55/93) dos dias mais frios observados durante o período de estudo. Neste período a média da temperatura mínima foi de 0,5°C em dezembro, 1,2°C em janeiro e de 0,0°C em fevereiro.

Relativamente à precipitação, os meses de dezembro, janeiro e fevereiro foram os meses mais chuvosos, com valores médios de precipitação de 139,3mm, 112,6mm e 102,2mm, respetivamente. Durante o período de estudo verificou-se que cerca de 65% (561,5/864,9mm) do total da precipitação ocorreu entre os meses de outubro a fevereiro, sendo que 41,0% (354,1/864,9mm) ocorreu durante os três meses mais chuvosos. Os meses de julho e agosto foram os mais secos, observando-se uma precipitação média de 14,6mm em cada um dos meses.

6.2. Caracterização da população estudada

Este estudo foi realizado numa população de 62 asininos (Quadros 8 e 9), constituída por 67,7% (n=42) de fêmeas, 30,7% (n=19) de machos esterilizados e 1,6% (n=1) de machos reprodutores.

Os animais permaneceram saudáveis durante o período de estudo.

De acordo com o índice de condição corporal considerado no ponto 4.4.1., referido nos materiais e métodos, a população foi categorizada em três grupos, de 2-2,5 (n=12), 3-3,5 (n=38) e 4-5 (n=12), observando-se uma média da condição corporal estimada em 3,2 (DP=0,6; mínimo=2; máximo=5), sendo que nas fêmeas a média da condição corporal foi estimada em 3,2 (DP=0,7; mínimo=2; máximo=5) e nos machos esterilizados em 3,2 (DP=0,5; mínimo=3; máximo=4).

O perímetro torácico (PTO) foi estimado de acordo com o ponto 4.4.1., referido no capítulo dos Materiais e Métodos. De acordo com o considerado, a população estudada consistiu em animais com PTO de 115-128cm (n=12), 130-149cm (n=33) e 150-168cm (n=17), tendo sido observado um valor médio de 141 centímetros (DP=12,2; mínimo=115; máximo=168), que evidenciou uma grande uniformidade morfométrica da população em estudo.

Quadro 8 - Caracterização da população de animais utilizados no estudo, desde dezembro de 2009 a setembro de 2014.

		n	%		n	%		n	%
Sexo	♀	42	67,7	♂ esterilizados	19	30,7	♂ reprodutor	1	1,6
Idade (anos)	2<4	9	14,5	4-10	30	48,4	>10	23	37,7
ICC	2-2,5	12	19,4	3-3,5	38	61,2	4-5	12	19,4
PTO (cm)	115-128	12	19,4	130-149	33	53,2	150-168	17	27,4

n número, % percentagem, ♀ fêmea, ♂ macho, < menor, > maior, ICC Índice Condição Corporal, PTO Perímetro torácico

Quadro 9 - Animais da Raça Asinina de Miranda utilizados no estudo epidemiológico durante um período de cinco anos, desde dezembro de 2009 a setembro de 2014.

Número de Identificação	Gênero	Idade Anos	PTO cm	Condição Corporal	Número de Identificação	Gênero	Idade anos	PTO cm	Condição Corporal
1 AEPGA	♀	4	141	3,0	32 AEPGA	♀	14	135	4,0
2 AEPGA	♀	6	150	2,5	33 AEPGA	♀	4	149	3,5
3 AEPGA	♀	4	140	3,0	34 AEPGA	♀	18	115	3,0
4 AEPGA	♀	2	149	4,0	35 AEPGA	♀	20	140	3,0
5 AEPGA	♀	2	158	3,0	36 AEPGA	♀	4	142	3,5
6 AEPGA	♀	6	155	3,0	37 AEPGA	♀	4	140	3,5
7 AEPGA	♀	2	155	3,0	38 AEPGA	♀	4	143	3,5
8 AEPGA	♀	6	139	3,0	39 AEPGA	♀	2	135	3,5
9 AEPGA	♀	3	149	2,5	40 AEPGA	♀	4	121	2,0
10 AEPGA	♀	3	168	3,5	41 AEPGA	♀	3	153	2,5
11 AEPGA	♀	5	132	3,0	42 AEPGA	♀	15	135	5,0
12 AEPGA	♀	6	139	2,5	43 AEPGA	○	20	123	3,0
13 AEPGA	♀	6	136	2,5	44 AEPGA	○	20	158	4,0
14 AEPGA	♀	12	137	3,0	45 AEPGA	○	20	159	3,0
15 AEPGA	♀	2	126	3,0	46 AEPGA	○	5	147	4,0
16 AEPGA	♀	6	133	2,0	47 AEPGA	○	6	120	3,0
17 AEPGA	♀	5	155	4,0	48 AEPGA	○	20	153	4,0
18 AEPGA	♀	15	133	4,5	49 AEPGA	○	12	163	2,5
19 AEPGA	♀	6	132	3,0	50 AEPGA	○	6	142	3,0
20 AEPGA	♀	6	128	3,0	51 AEPGA	○	4	157	2,5
21 AEPGA	♀	12	125	4,5	52 AEPGA	○	15	133	4,0
22 AEPGA	♀	4	149	3,0	53 AEPGA	○	15	159	3,5
23 AEPGA	♀	4	128	2,5	54 AEPGA	○	20	143	3,0
24 AEPGA	♀	20	125	3,0	55 AEPGA	○	18	128	2,5
25 AEPGA	♀	5	154	3,0	56 AEPGA	○	20	154	3,0
26 AEPGA	♀	18	147	3,5	57 AEPGA	○	12	137	3,5
27 AEPGA	♀	6	142	4,5	58 AEPGA	○	20	140	3,5
28 AEPGA	♀	2	130	2,5	59 AEPGA	○	5	125	3,0
29 AEPGA	♀	6	154	3,0	60 AEPGA	○	18	122	3,5
30 AEPGA	♀	4	154	4,0	61 AEPGA	○	20	133	3,0
31 AEPGA	♀	6	146	3,0	62 AEPGA	♂	4	148	3,0

♀ fêmea, ♂ macho reprodutor, ○ macho esterilizado

6.3. Parasitismo dos animais

Durante o período de estudo foi possível determinar a prevalência de parasitismo assim como o nível de infecção parasitária da população alvo (Quadro 10).

Quadro 10 - Prevalência de infecção parasitária e valores de OPG de mensais observados durante os cinco anos de estudo, de dezembro 2009 a setembro 2014.

Meses	Observados	Prevalência		Distribuição dos níveis de OPG					
		Positivos		50-450		500-1000		>1000	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%
dez-09	62	22	35,5	11	50,0	11	50,0	0	0,0
mar-10	62	20	32,3	12	60,0	8	40,0	0	0,0
jun-10	62	28	45,2	15	53,6	13	46,4	0	0,0
set-10	62	17	27,4	9	52,9	8	47,1	0	0,0
Médias	62,0	21,8	35,1	11,8	54,1	10,0	45,9	0,0	0,0
dez-10	62	15	24,2	14	93,3	1	6,7	0	0,0
mar-11	62	61	98,4	37	60,7	13	21,3	12	19,7
jun-11	62	38	61,3	8	21,1	13	34,2	15	39,5
set-11	62	31	50,0	19	61,3	5	16,1	9	29,0
Médias	62,0	36,3	58,5	19,5	59,1	8,0	19,6	9,0	22,1
dez-11	62	29	46,8	17	58,6	7	24,1	5	17,2
mar-12	62	27	43,5	20	74,1	3	11,1	4	14,8
jun-12	62	34	54,8	16	47,1	16	47,1	2	5,8
set-12	62	19	30,6	13	68,4	6	31,6	0	0,0
Médias	62,0	27,3	43,9	16,5	62,1	8,0	28,5	2,8	9,5
dez-12	62	15	24,2	11	73,3	4	26,7	0	0,0
mar-13	62	24	38,7	20	83,3	4	16,7	0	0,0
jun-13	62	27	43,5	18	66,7	9	33,3	0	0,0
set-13	62	17	27,4	7	41,2	10	58,8	0	0,0
Médias	62,0	20,8	33,5	14,0	66,1	6,8	33,9	0,0	0,0
dez-13	62	14	22,6	10	71,4	4	28,6	0	0,0
mar-14	62	14	22,6	12	85,7	2	14,3	0	0,0
jun-14	62	17	27,4	12	70,6	5	29,4	0	0,0
set-14	62	12	19,4	7	58,3	5	41,7	0	0,0
Médias	62,0	14,3	23,0	10,3	71,5	4,0	28,5	0,0	0,0

6.3.1. Prevalência

Considerando o total de animais analisados que evidenciaram a presença de ovos nas fezes, com valores iguais ou superiores a 50 OPG, procedeu-se à determinação do valor da prevalência. Ao longo dos cinco anos de estudo, observou-se uma diminuição do valor da taxa de prevalência média anual de 35,1% para 23,0% dos animais sujeitos ao controlo anti-

helmíntico seletivo, observação ilustrada pela linha de tendência apresentada no Gráfico 2. Contudo, durante o segundo ano de estudo, observou-se um aumento de 23,4%, registrando-se 58,5% de prevalência média anual com um valor mensal máximo de 98,4% em março de 2011, quando 61 dos 62 animais estudados se encontravam parasitados.

A prevalência de infecção dos animais apresentou flutuação sazonal ao longo dos cinco anos de estudo (Gráficos 2 e 3). Os valores de prevalência mais elevados foram observados entre os meses de março e junho, e os valores de prevalência mais baixos verificaram-se entre os meses de setembro e dezembro.

Gráfico 2 - Prevalência de parasitismo observada ao longo do período de estudo, com linha de tendência.

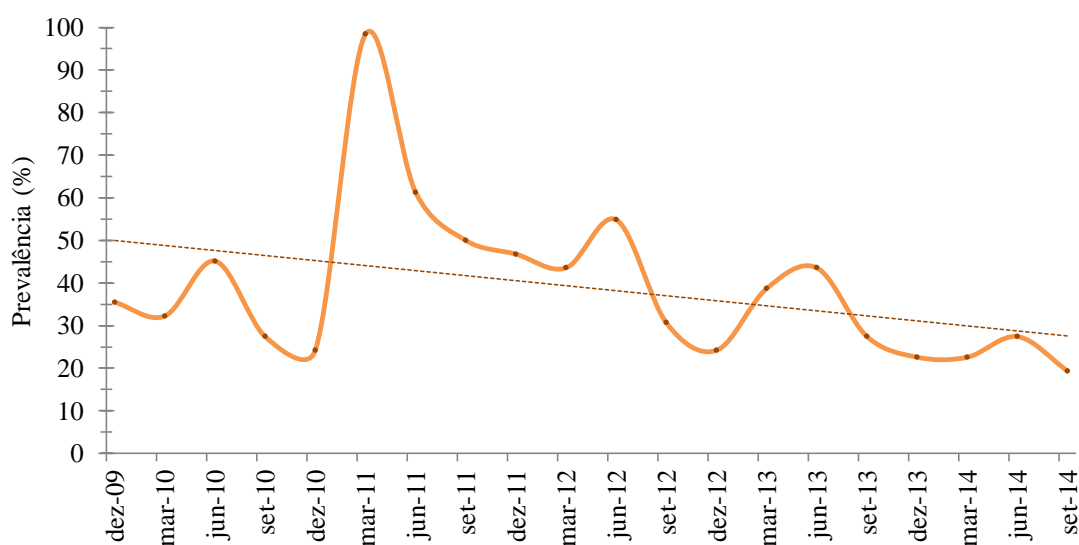
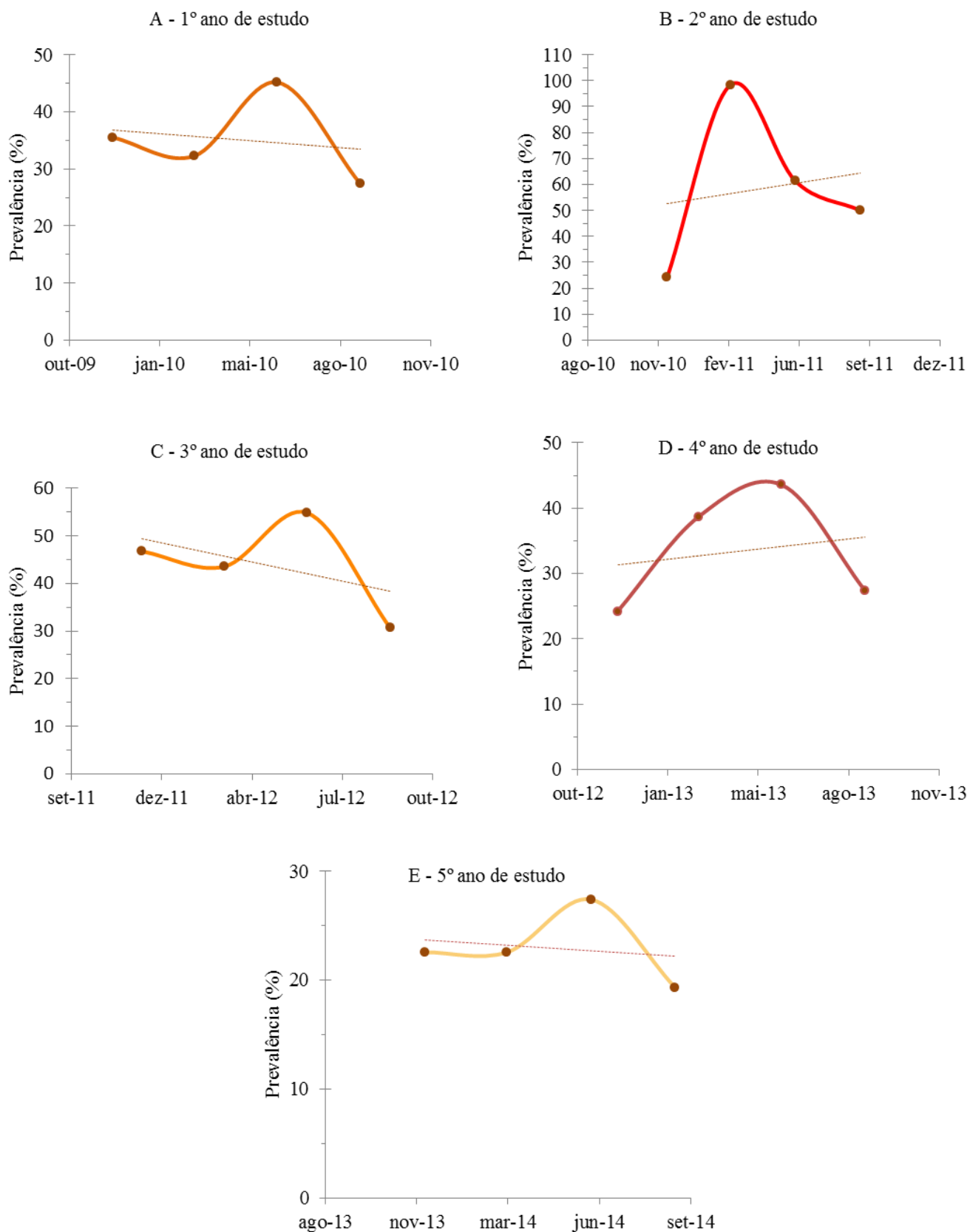
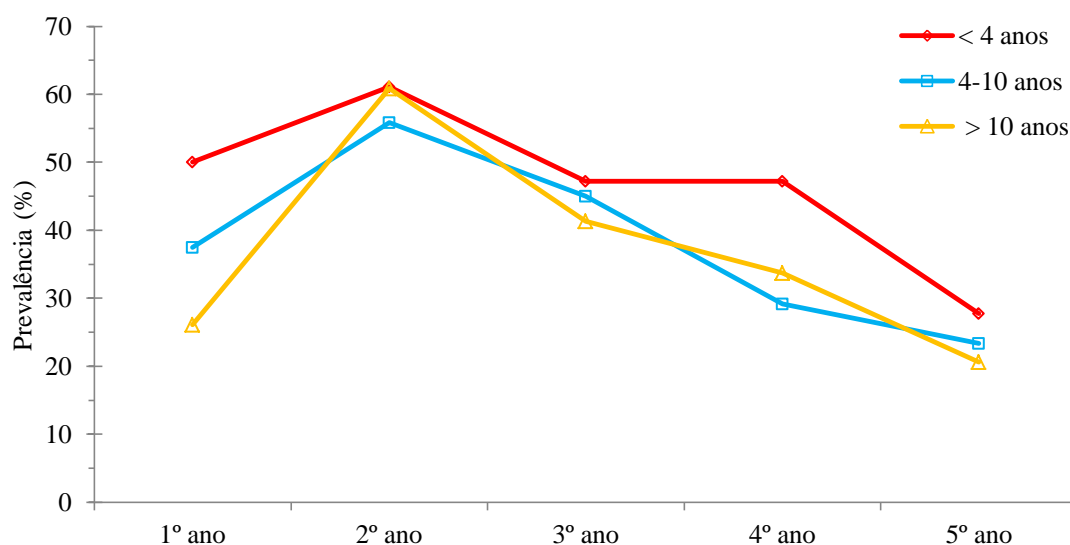


Gráfico 3 - Prevalências de parasitismo observadas ao longo dos cinco anos de estudo (A, B, C, D e E), com as respectivas linhas de tendência.



A média da taxa de prevalência de infecção global foi superior (46,7%; IC95%:16,7-78,9%) nos animais com idade inferior a quatro anos, seguindo-se o grupo de animais com idade entre quatro e dez anos (38,2%; IC95%:21,8-57,6%) e com uma taxa de prevalência inferior nos animais com idade superior a dez anos (35,6%; IC95%:17,8-60,0%) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Média global da taxa de prevalência de infecção por grupos etários.



Uma análise detalhada da taxa de prevalência de infecção, ao longo do período de estudo e por grupos etários (Gráfico 5), permitiu observar que o aumento da taxa de prevalência no segundo ano de estudo ocorreu em todos os grupos etários. No entanto, nos dois últimos anos o grupo de animais com idade inferior a quatro anos apresentou uma taxa de prevalência de infecção superior aos restantes grupos (Gráfico 6). No final do estudo, verificou-se uma convergência em todos os grupos etários para uma taxa de prevalência de 19,9% (IC95%:11,2-32,3%) observada no mês de setembro de 2014.

O teste ANOVA evidenciou uma diferença estatisticamente significativa na prevalência de infecção entre os grupos etários. Esta diferença observou-se entre o grupo de idade inferior a quatro anos e de quatro a dez anos ($p=0,0029$) e entre o grupo de idade inferior a quatro anos e o grupo de idade superior a dez anos ($p=0,0004$).

Gráfico 5 - Variação da taxa de prevalência de infecção por grupos etários durante o período de estudo.

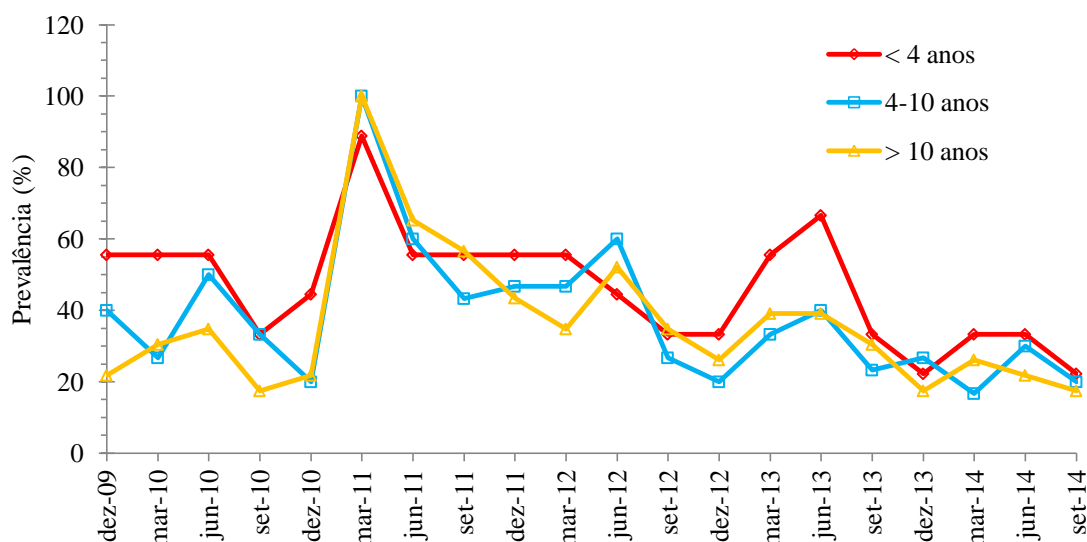
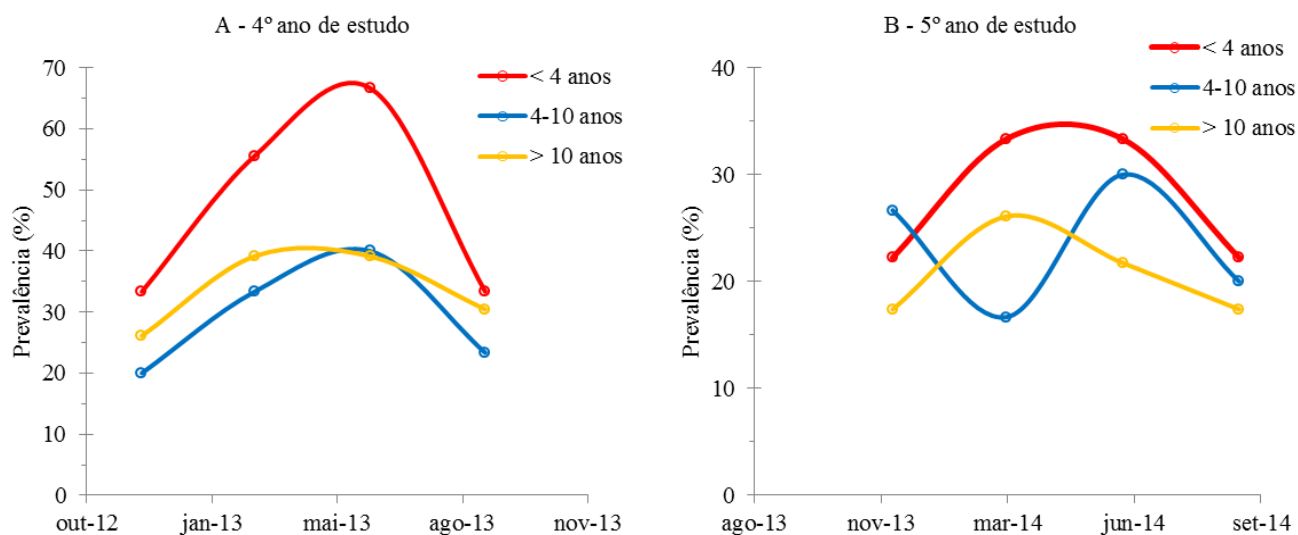


Gráfico 6 - Taxa de prevalência de infecção dos grupos etários nos dois últimos anos de estudo (A - 4º ano, B - 5º ano).



A análise dos resultados da taxa de prevalência em relação ao sexo revelou uma distribuição semelhante em ambos os sexos ao longo do período de estudo (Gráficos 7 e 8). Não se verificou uma associação significativa entre o sexo e a média da taxa de prevalência de infecção observada em fêmeas (média=39,5; DP=13,4) e em machos (média=37,1; DP=14,5). Esta análise não considerou o grupo de machos inteiros por ser constituído apenas por um animal.

Gráfico 7 - Variação da taxa de prevalência de infecção por sexo durante o período de estudo.

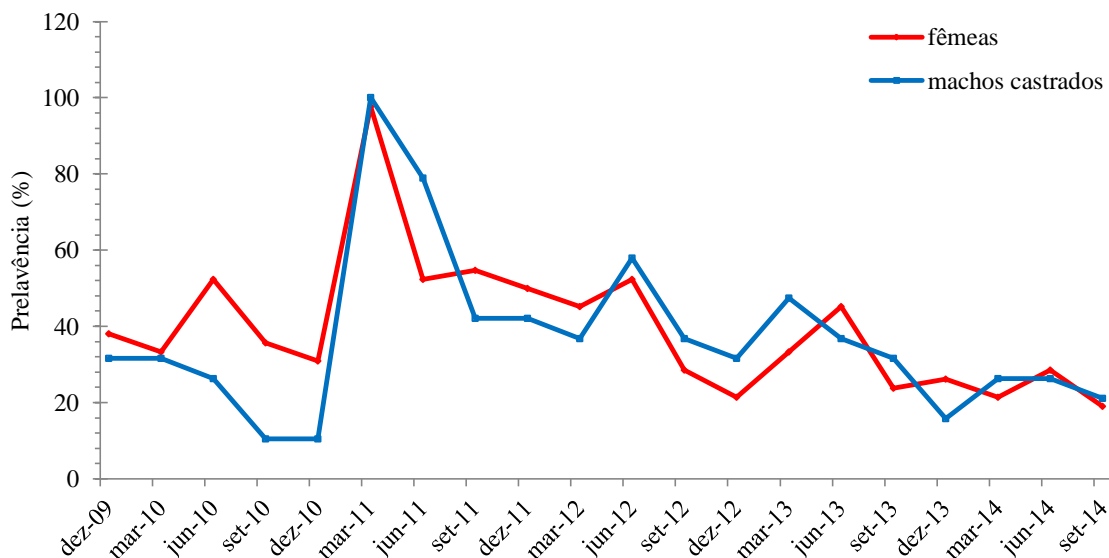
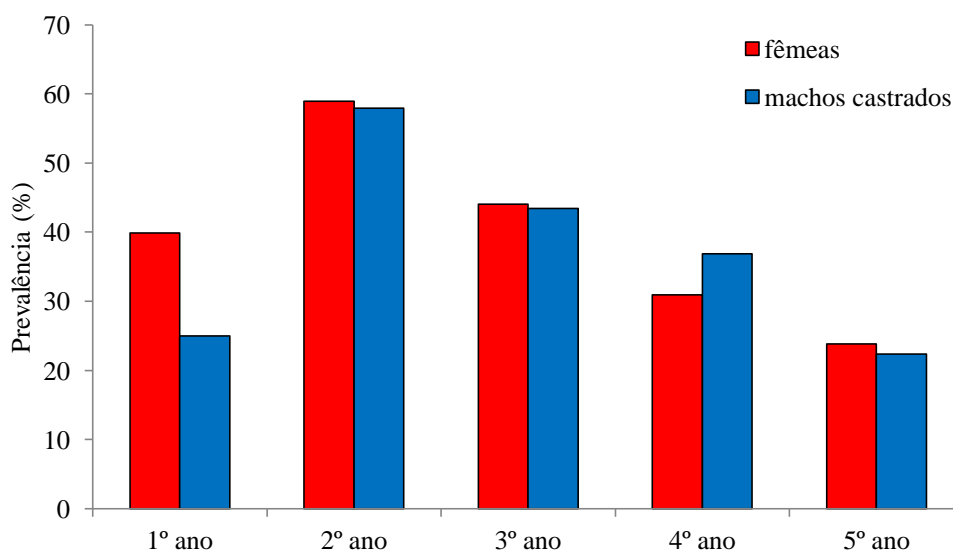


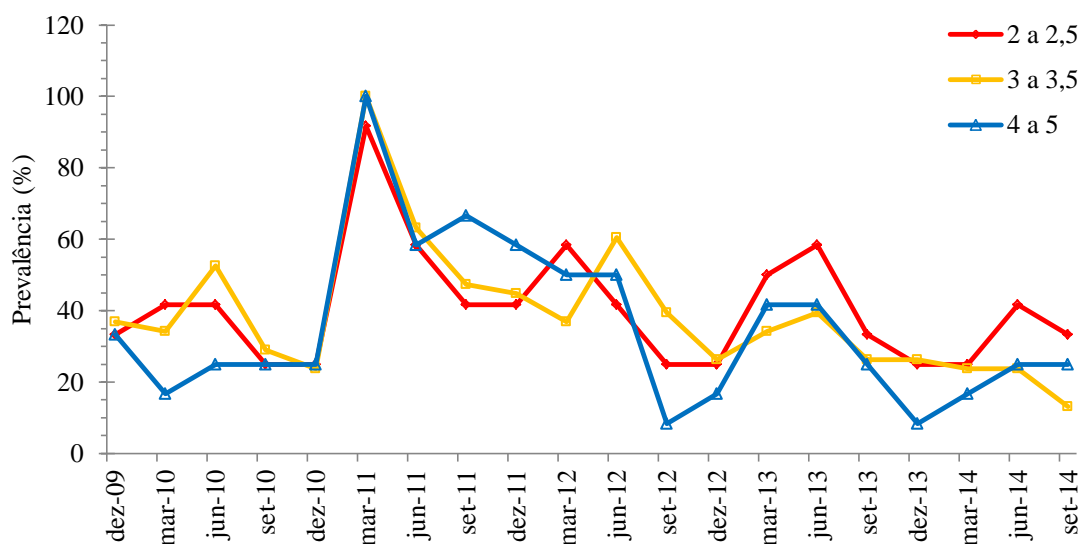
Gráfico 8 - Registo anual da taxa de prevalência com distribuição semelhante em ambos os sexos.



Relativamente ao número de reinfeções ocorridas durante o período de estudo, verificou-se uma diferença significativa entre os sexos. O teste ANOVA revelou uma diferença estatística ($p=0,0027$) na média da frequência de novas infeções entre fêmeas (média=6,9, DP=5,5) e machos esterilizados (média=2,6, DP=2,3).

Uma análise global permitiu verificar que a taxa de prevalência de infecção foi mais baixa nos animais de maior condição corporal (4-5) (35,8%; IC95%:12,8-66,7%) e mais elevada nos animais de menor condição corporal (2-2,5) (40,8%; IC95%:16,0-70,7%). A variação da taxa de prevalência em relação à condição corporal durante o período de estudo encontra-se representada no Gráfico 9. No entanto, e apesar de os dados apontarem nesse sentido, não se verificou uma associação significativa entre a condição corporal e a taxa de prevalência.

Gráfico 9 - Variação da taxa de prevalência em relação à condição corporal durante o período de estudo.



A taxa de prevalência de infecção não apresentou diferenças significativas em relação ao PTO, observando-se valores de prevalência média global de 37,5% (DP=19,8; máximo=100; mínimo=16,7), 39,8% (DP=20,1; máximo=97,0; mínimo=15,2), 37,6% (DP=25,0; máximo=100; mínimo=5,9), para os respetivos valores de PTO 115-128, 130-149 e 150-168 centímetros.

A taxa de prevalência de infecção foi analisada em relação a variáveis meteorológicas, nomeadamente precipitação, temperatura média, temperatura mínima e temperatura máxima. A análise pelo teste de Spearman não demonstrou a existência de correlações entre a taxa de prevalência e as variáveis meteorológicas (Quadro 11).

Quadro 11 - Correlação entre a prevalência de parasitismo mensal e as variáveis meteorológicas observadas durante o período de estudo.

Coefficientes	Prec. Total	Temp. média	Temp. mínima	Temp. máxima
r	-0,21	0,05	0,03	-0,03
p	0,36	0,82	0,86	0,87
IC95%	-0,59; 0,25	-0,40; 0,48	-0,41; 0,47	-0,47; 0,41

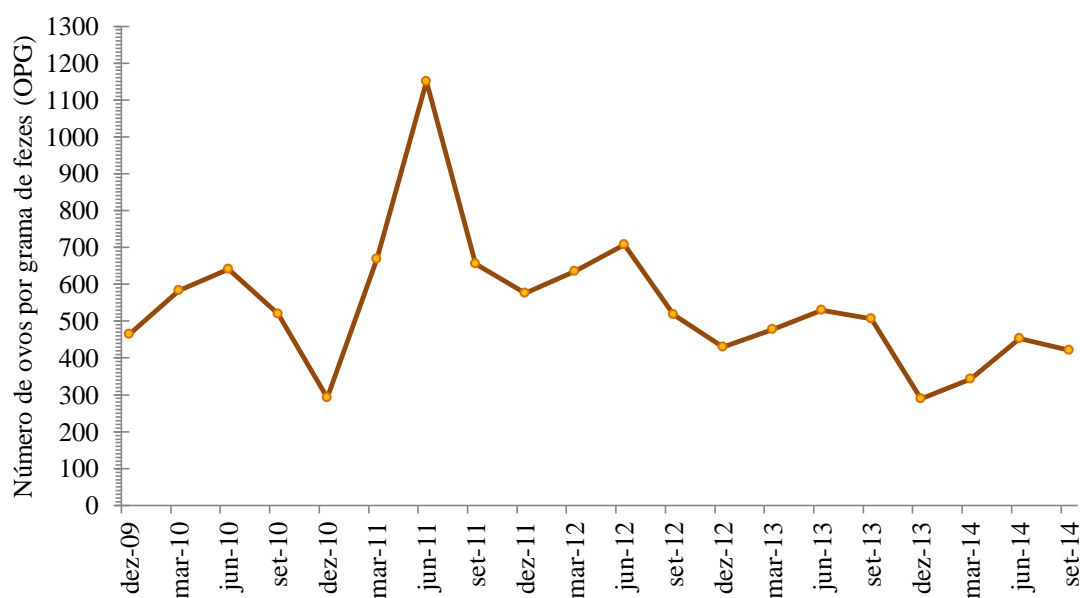
6.3.2. Nível de infecção parasitária

O nível de infecção parasitária (NIP) foi determinado com base nos valores de ovos por grama de fezes (OPG), de acordo com o ponto 4.4.3.3., referido do Capítulo 4.

6.3.2.1. Ovos por grama de fezes (OPG)

Durante o período de estudo foi possível observar uma flutuação dos valores médios de OPG com uma redução progressiva na amplitude (Gráfico 10). Entre dezembro de 2009 e setembro de 2014 verificou-se inicialmente um aumento até junho de 2011 seguido de uma diminuição progressiva e paulatina da excreção de ovos até setembro de 2014.

Gráfico 10 - Níveis mensais médios de OPG durante o período de estudo.



De acordo com o Quadro 12 e Gráfico 11, ao longo dos cinco anos, ocorreu uma redução do valor médio de OPG, de 551,4 OPG no primeiro ano para 376,5 OPG no último ano de estudo. No entanto, no segundo e terceiro anos de estudo os valores médios foram de 691,4 OPG e 609,2 OPG, respectivamente. As curvas de excreção de ovos observadas nos cinco anos de estudo podem ser observadas no Gráfico 12.

O teste ANOVA realizado para o valor de OPG, no mesmo mês em anos diferentes, permitiu observar diferenças significativas entre o mês de junho de 2010 e junho de 2011 ($p=0,002$), dezembro de 2010 e dezembro de 2011 ($p=0,008$) e junho de 2011 e junho de 2012 ($p=0,004$).

Quadro 12 - Valores de OPG observados durante o período de estudo.

Meses	Valores médios mensais de OPG					Média
	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	5º ano	
dezembro	463,6	292,9	575,9	430,0	289,3	410,3
março	582,5	668,0	635,2	477,1	342,9	541,1
junho	640,7	1150,0	707,4	529,6	452,9	696,1
setembro	518,8	654,8	518,4	505,9	420,8	523,7
Média anual	551,4	691,4	609,2	485,6	376,5	542,8
Mínimo	463,6	292,9	518,4	430,0	289,3	410,3
Máximo	640,7	1150,0	707,4	529,6	452,9	696,1
Desvio padrão	76,8	351,7	81,0	42,9	74,3	117,5
Erro padrão da média	19,2	87,9	20,2	55,1	10,7	29,4

Gráfico 11 - Valores de OPG médios anuais observados durante os cinco anos de estudo, de dezembro de 2009 a setembro de 2014.

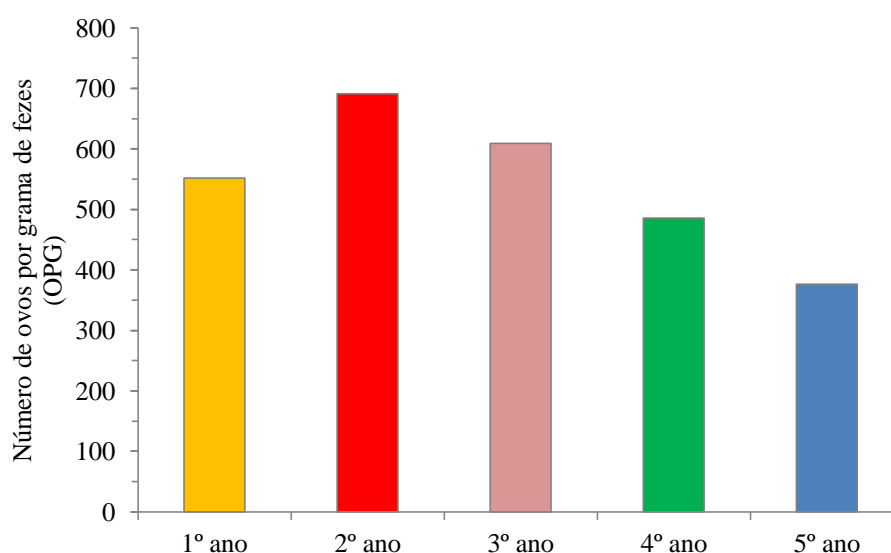
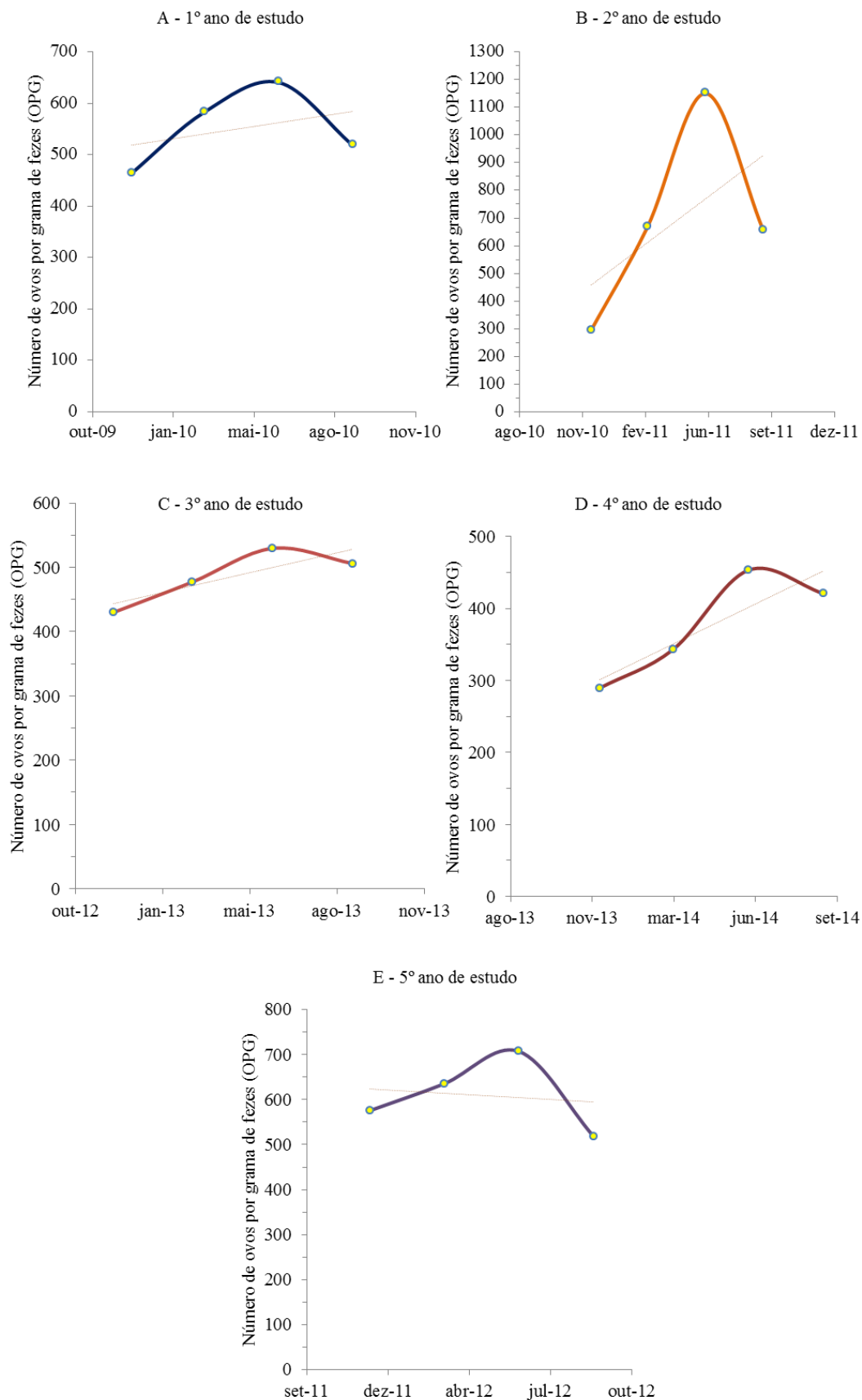


Gráfico 12 - Curvas de excreção de ovos observadas ao longo dos cinco anos de estudo (A, B, C, D e E), com as respectivas linhas de tendência.



A análise de variância dos níveis médios mensais de OPG, através do teste de ANOVA, permitiu verificar que houve diferenças significativas entre alguns meses no período de estudo (Quadro 13).

Quadro 13 - Resultados do teste ANOVA para níveis de OPG entre os meses, durante o período de estudo.

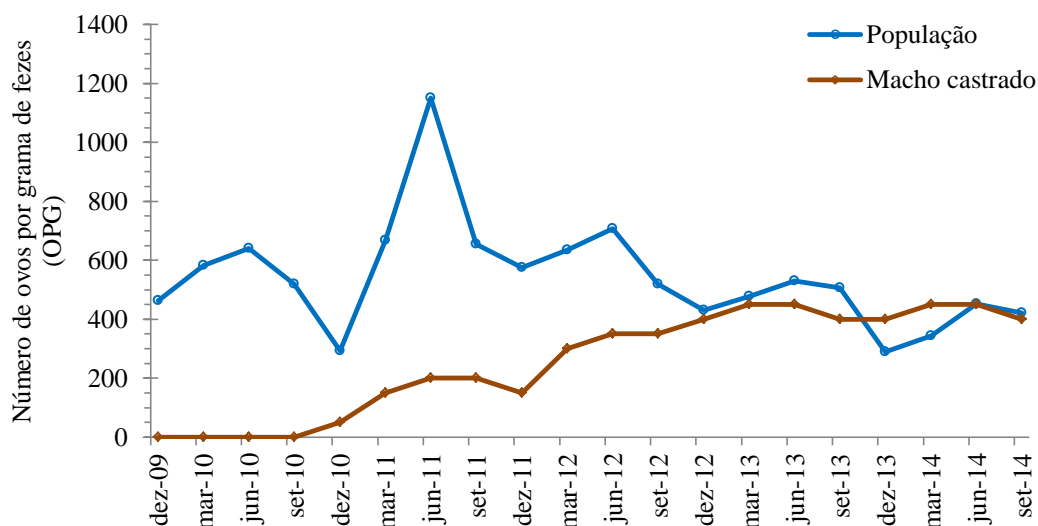
	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	5º ano
dezembro/março	ns	p=0,009	ns	ns	ns
março/junho	ns	p=0,0003	ns	ns	ns
junho/setembro	ns	p=0,003	ns	ns	ns
setembro/dezembro	p=0,007	ns	ns	p=0,003	ns

ns - não significativo

A mesma análise efetuada para avaliação global da média do valor de OPG em todos os anos, permitiu observar diferenças significativas entre o segundo e o quinto ano do estudo ($p<0,05$).

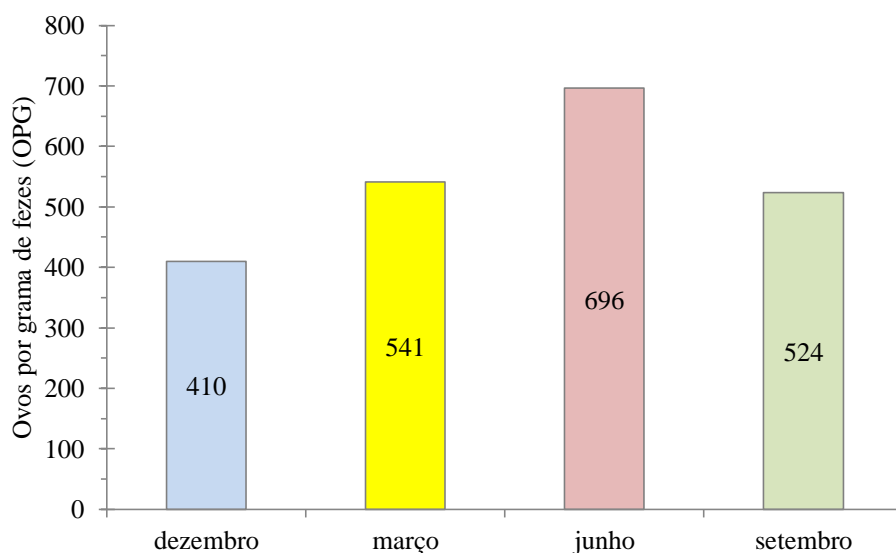
Um macho castrado com idade entre 15 a 20 anos apresentou uma curva de eliminação fecal de ovos diferente da registada na restante população (Gráfico 13). Este animal, com PTO de 159 centímetros e nível três de condição corporal, apresentou resultados negativos durante o primeiro ano de estudo e, em dezembro de 2010 foi observada uma excreção de 50 OPG que aumentou progressivamente ao longo de quatro anos de estudo. Nos dois últimos anos, o valor de OPG aproximou-se da média da população sem exceder os 450 OPG, não tendo sido desparasitado durante todo o período de estudo.

Gráfico 13 - Comparação entre os níveis médios de OPG da população de asininos e os valores de OPG registados num macho castrado durante o período de estudo.



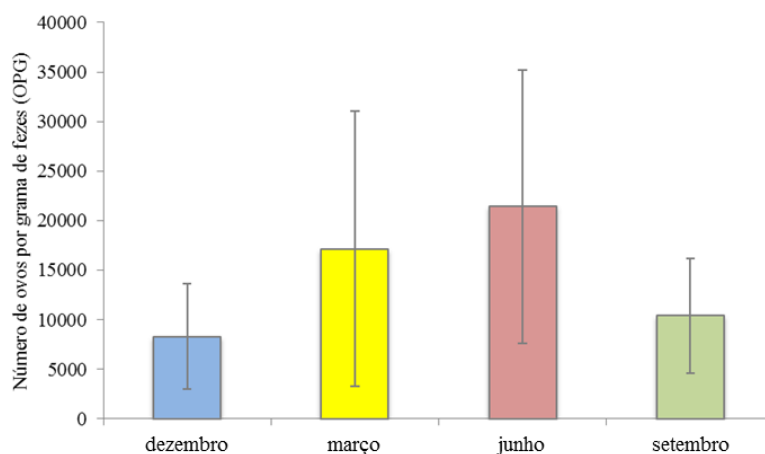
O estudo da eliminação de ovos de estrongilídeos permitiu evidenciar uma sazonalidade na excreção. O valor médio global de eliminação de ovos registado nos meses de junho (696,1 OPG) foi o mais elevado, observando-se um decréscimo nos meses de setembro (523,7 OPG) e dezembro (410,3 OPG), mês em que se registou o valor de eliminação mais baixo. Verificou-se um aumento progressivo nos meses de março (541,1 OPG) até junho (Gráfico 14), mês com valor médio de excreção mais elevado.

Gráfico 14 - Valores médios globais de OPG observados em cada mês.



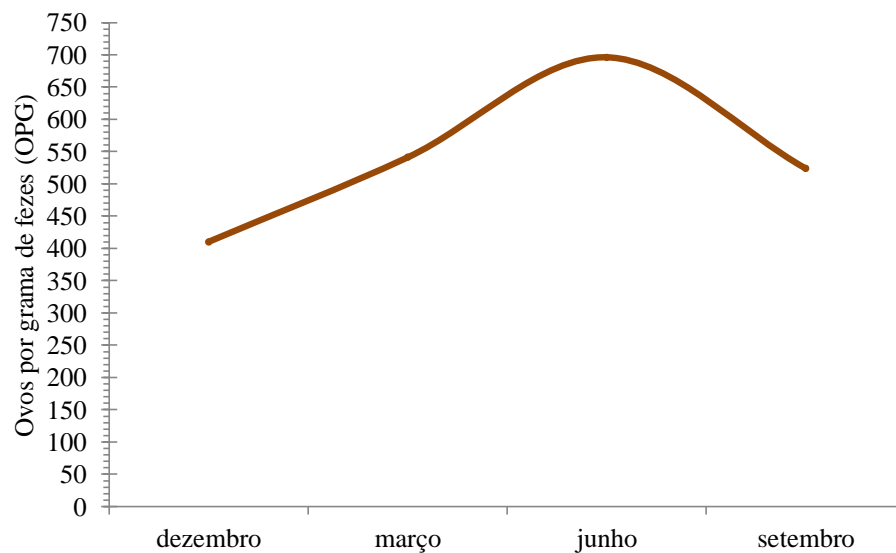
Os valores absolutos de OPG, observados durante o período de estudo, e respetivo erro padrão, podem ser observados no Gráfico 15.

Gráfico 15 - Valores totais de OPG observados em cada mês durante período de estudo, com erro padrão da média.



Pela observação do Gráfico 16 verifica-se um aumento progressivo na excreção fecal de ovos desde dezembro até junho, mês que se atinge um pico máximo na eliminação de ovos; decrescendo depois progressivamente a excreção nos meses de setembro até dezembro. Este padrão sazonal de excreção permite observar a curva anual de excreção de ovos de estrongilídeos parasitas de asininos da Raça de Miranda, no Planalto Mirandês.

Gráfico 16 - Curva anual de excreção de ovos de estrongilídeos parasitas de asininos da Raça de Miranda, no Planalto Mirandês.

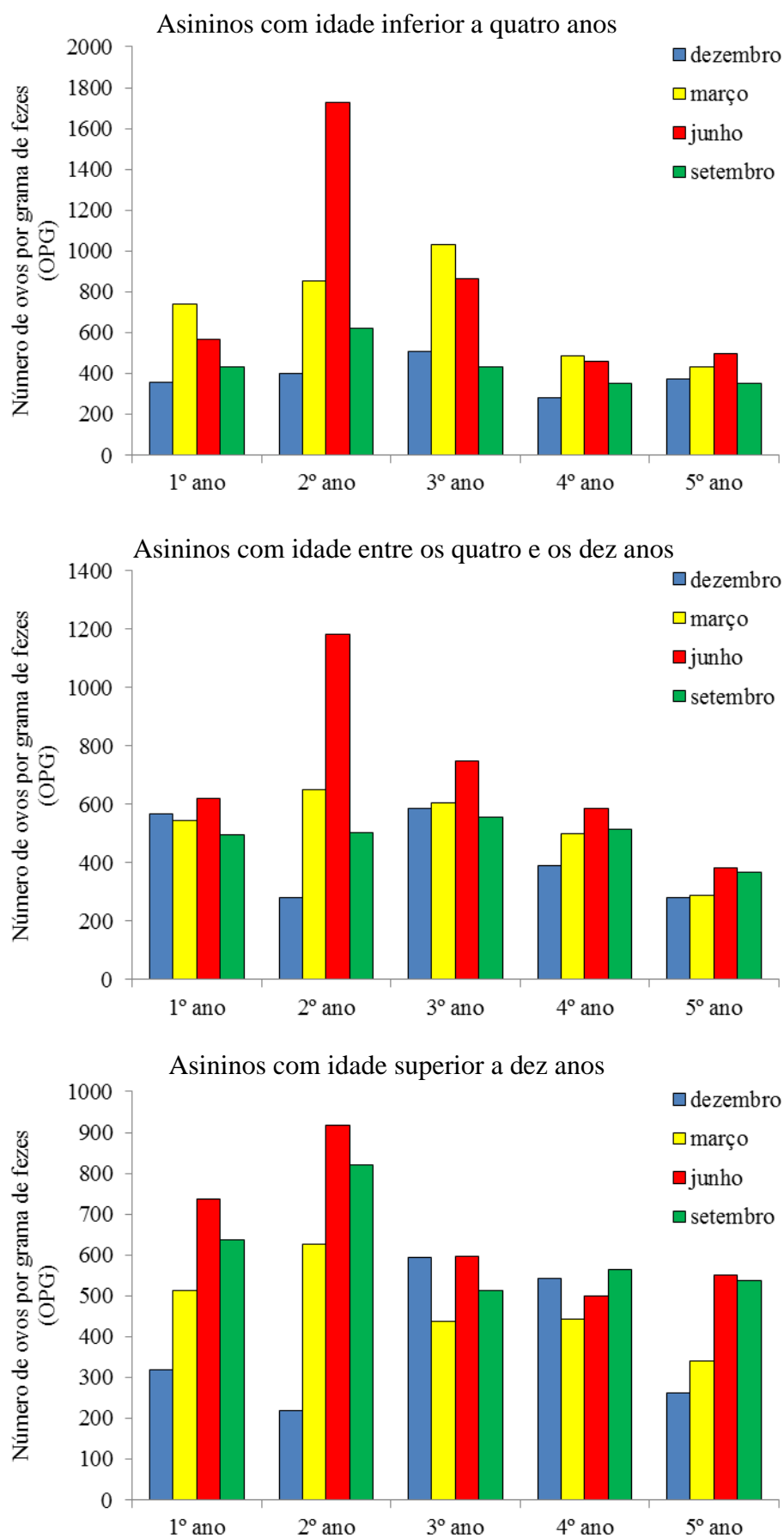


A análise dos níveis médios de OPG por grupo etário foi realizada com base nos dados expostos no Quadro 14 e Gráfico 17.

Quadro 14 - Valores de OPG observados em função da idade dos animais estudados.

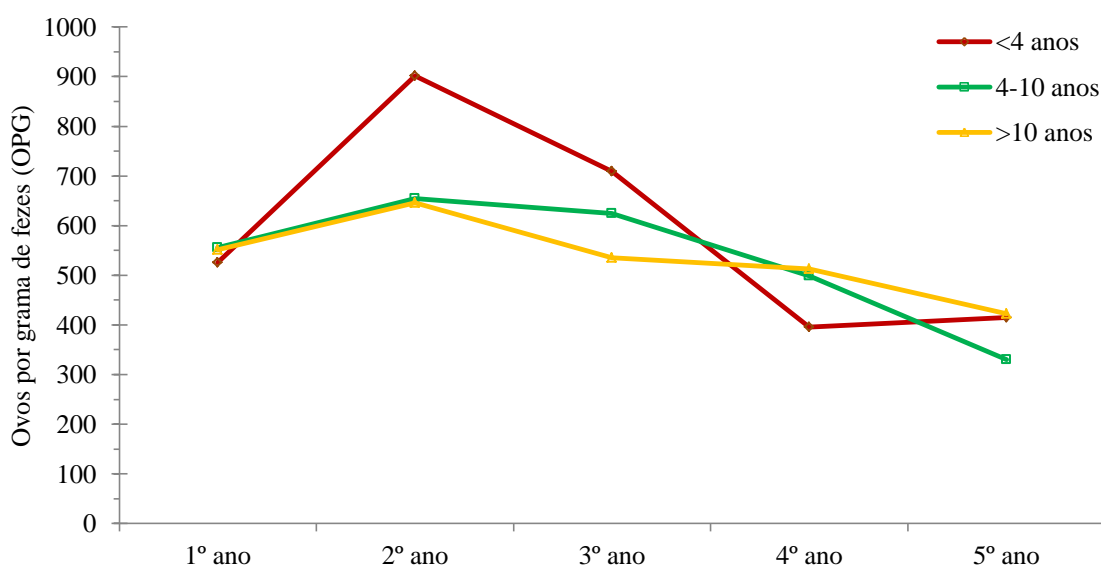
Valores médios mensais de OPG							
Meses	Idade	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	5º ano	Média
<4 anos							
dezembro		360,0	400,0	510,0	283,3	375,0	385,7
março		740,0	856,3	1030,0	490,0	433,3	709,9
junho		570,0	1730,0	862,5	458,3	500,0	824,2
setembro		433,3	620,0	433,3	350,0	350,0	437,3
Média		525,8	901,6	709,0	395,4	414,6	589,3
Mínimo		360,0	400,0	433,3	283,3	350,0	385,7
Máximo		740,0	1730,0	1030,0	490,0	500,0	824,2
Desvio padrão		144,8	504,8	246,1	83,0	57,8	183,2
4-10 anos							
dezembro		566,7	280,0	585,7	391,7	281,3	421,1
março		543,8	650,0	607,1	500,0	290,0	518,2
junho		620,0	1183,3	747,2	587,5	383,3	704,3
setembro		494,4	503,8	556,3	514,3	366,7	487,1
Média		556,2	654,3	624,1	498,4	330,3	532,7
Mínimo		494,4	280,0	556,3	391,7	281,3	421,1
Máximo		620,0	1183,3	747,2	587,5	383,3	704,3
Desvio padrão		52,1	384,1	84,7	80,8	52,2	121,4
>10 anos							
dezembro		320,0	220,0	595,0	541,7	262,5	387,8
março		514,3	626,1	437,5	444,4	341,7	472,8
junho		735,7	916,7	595,8	500,0	550,0	659,6
setembro		637,5	819,2	512,5	564,3	537,5	614,2
Média		551,9	645,5	535,2	512,6	422,9	533,6
Mínimo		320,0	220,0	437,5	444,4	262,5	387,8
Máximo		735,7	916,7	595,8	564,3	550,0	659,6
Desvio padrão		179,2	308,3	76,0	52,7	143,3	125,6

Gráfico 17 - Valores anuais de OPG observados em função do grupo etário.



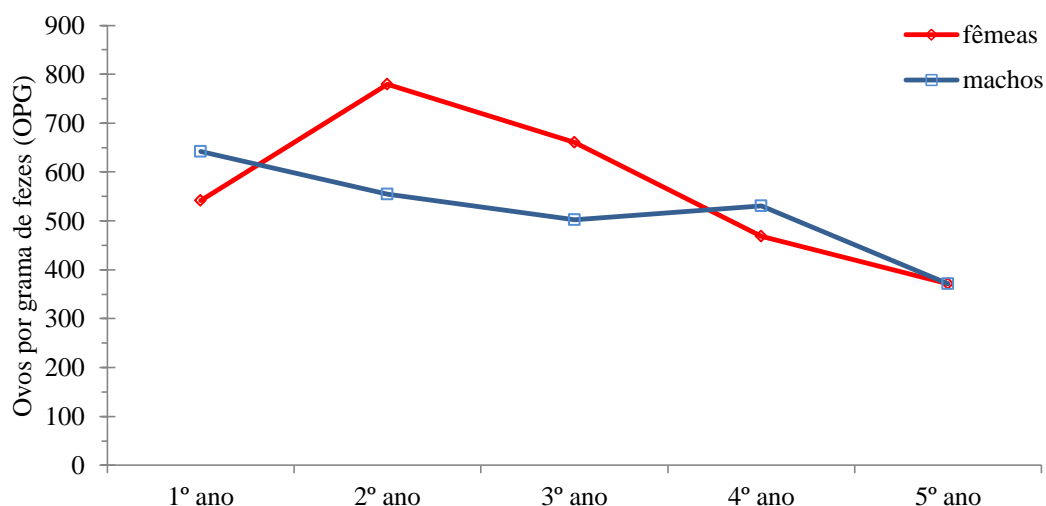
O grupo de animais com idade inferior a quatro anos apresentou a maior flutuação na excreção de ovos observada ao longo dos cinco anos de estudo (Gráfico 18). Neste grupo ocorreu um pico de excreção no segundo e no terceiro anos, 901,6 OPG e 709,0 OPG respectivamente; coincidindo com o pico de excreção de ovos verificado no segundo (1150,0 OPG) e terceiro (707,4 OPG) anos observado na população geral (Gráfico 10). Nos restantes animais verificou-se uma diminuição progressiva da excreção de ovos de estrongilídeos. Contudo, os animais com idade entre quatro e dez anos apresentaram uma maior redução da excreção de ovos comparativamente com os animais de idade superior a dez anos que registaram valores de OPG mais constantes e estáveis ao longo do estudo.

Gráfico 18 - Flutuação do valor de OPG em função da idade da população estudada, ao longo dos cinco anos de estudo.



A análise de variância (ANOVA) evidenciou a existência de diferença significativa nos níveis de OPG entre animais com menos de quatro anos e animais com mais de dez anos ($p=0,032$). A análise da excreção de OPG em relação ao sexo permitiu observar que a média global do valor de OPG foi semelhante em ambos; 564,5 OPG nas fêmeas e 520,3 OPG nos machos. Contudo, o cálculo da média anual do valor de OPG para cada sexo permitiu verificar que ocorreu uma maior excreção nas fêmeas no segundo (779,9 OPG) e terceiro (660,1 OPG) anos do estudo do que nos machos esterilizados que apresentaram valores médios de 554,5 OPG e 502,3 OPG no segundo e terceiro anos, respectivamente (Gráfico 19). O teste ANOVA permitiu verificar a existência de diferença estatisticamente significativa nos valores de OPG entre sexos ($p=0,002$).

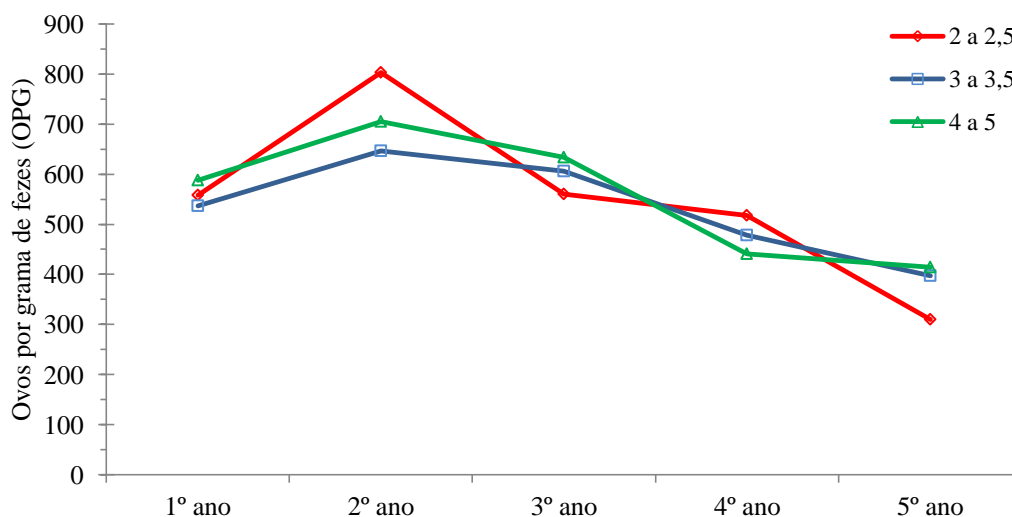
Gráfico 19 - Variação dos valores anuais médios de OPG em relação ao sexo, ao longo dos cinco anos de estudo.



Relativamente à análise da excreção considerando a condição corporal, verificou-se que a média global do valor de OPG foi semelhante nos três grupos; 550 OPG nos animais com 2-2,5, 533 OPG nos animais de 3-3,5 e 556 OPG nos animais 4-5. No entanto, no segundo ano do estudo verificou-se que os animais com condição corporal 2-2,5 apresentaram uma excreção superior aos restantes, apresentando uma média anual de 803 OPG (Gráfico 20).

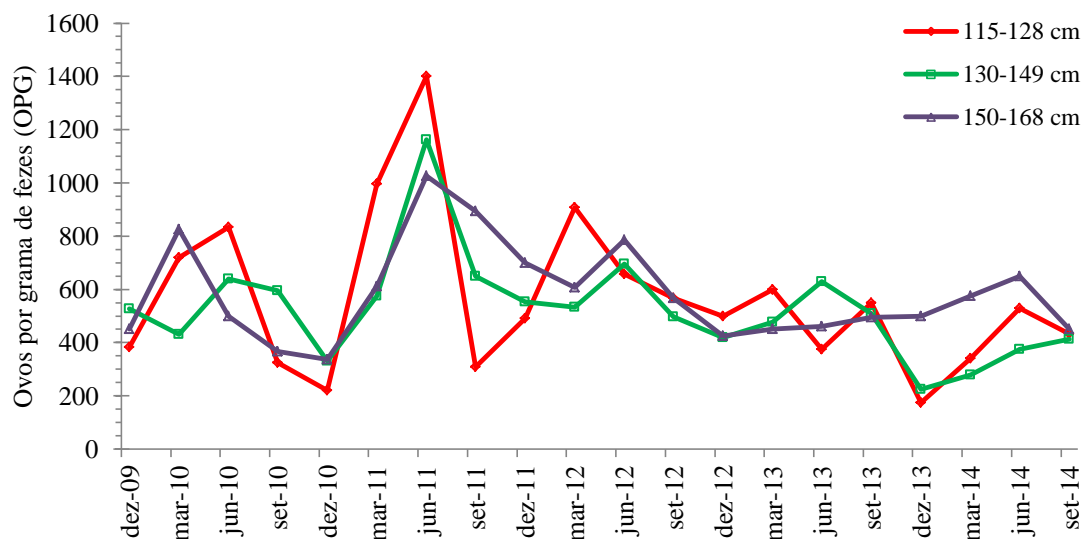
A análise de variância (ANOVA) evidenciou a existência de diferença estatisticamente significativa nos valores de OPG entre os grupos com condição corporal 2-2,5 e 3-3,5 ($p < 0,001$) e entre os grupos 3-3,5 e 4-5 ($p < 0,0006$).

Gráfico 20 - Variação dos valores anuais médios de OPG em relação à condição corporal, ao longo dos cinco anos de estudo.



A análise de variância (ANOVA) da excreção de ovos relativamente à condição corporal baseada no PTO apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 115-128 e 130-149 ($p<0,004$) e entre os grupos 130-149 e 150-168 ($p=0,03$) (Gráfico 21).

Gráfico 21 - Variação dos valores anuais médios de OPG em relação ao PTO, ao longo dos cinco anos de estudo.



A análise da correlação pelo teste de Spearman, entre os valores médios de OPG e as variáveis meteorológicas no período de estudo, não permitiu observar correlações estatisticamente significativas com a temperatura e com a precipitação.

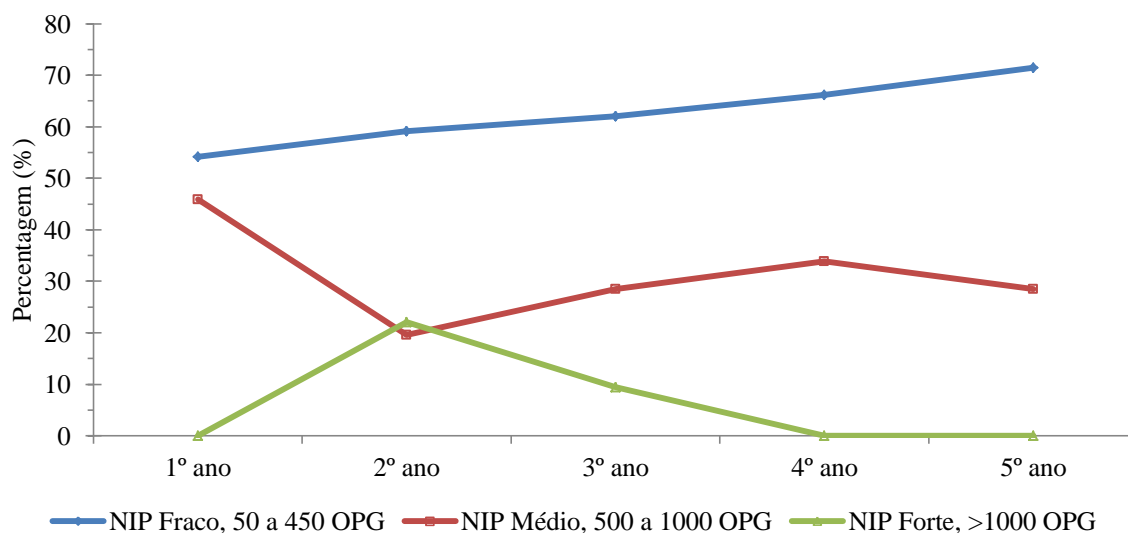
Durante o período do estudo, o número médio de desparasitações foi de 3,2 nas fêmeas ($DP=0,7$) e de 2,7 ($DP=1,1$) nos machos. Verificou-se que as diferenças das médias entre fêmeas e machos é estatisticamente significativa ($p=0,012$), ou seja, o tempo médio entre desparasitações é diferente de machos para fêmeas, sendo mais curto para estas. A análise do número médio de desparasitações para os cinco anos de estudo permitiu estimar o intervalo entre desparasitações, de 22,4 meses nos machos e de 16,2 meses nas fêmeas.

6.3.2.2. Nível de infecção parasitária (NIP)

Ao longo do período de estudo observou-se uma diminuição do nível de infecção parasitária (NIP) nos asininos sujeitos ao controlo parasitário seletivo. A taxa de prevalência de animais com NIP médio diminuiu de 45,9% para 28,5% tendo a taxa de prevalência de animais com NIP fraco aumentado de 54,1% para 71,5%. Os animais fortemente parasitados, eliminadores

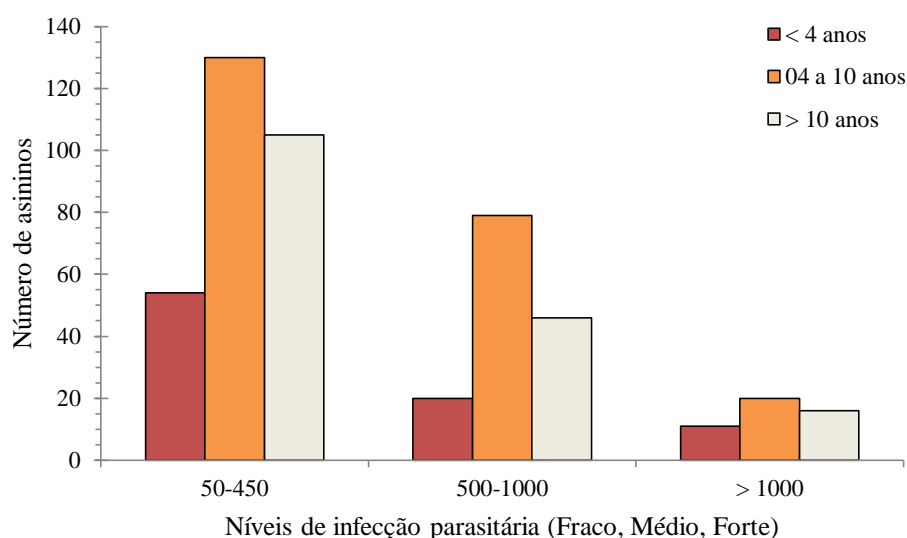
de valores superiores a 1000 OPG, surgiram no segundo ano (22,1%) e permaneceram no terceiro (9,5%) tendo desaparecido no quarto e quinto anos do estudo (Gráfico 22).

Gráfico 22 - Níveis de infecção parasitária (NIP) associados ao número médio de OPG observados durante o período de estudo.



Relativamente aos grupos etários, observou-se que em todos os níveis de infecção parasitária houve maior participação de animais com idade entre quatro e dez anos, seguindo-se os animais com mais de dez anos e por fim os animais mais jovens com menos de quatro anos (Gráfico 23).

Gráfico 23 - Distribuição do NIP em relação aos grupos etários.



A análise estatística (ANOVA) permitiu observar diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos etários e os diferentes níveis de infecção parasitária ($p < 0,0001$).

O nível de infecção parasitária apresentou variações ao longo do período de estudo entre os sexos e os meses do ano (Gráficos 24 e 25).

Relativamente ao sexo, o teste ANOVA permitiu observar a existência de diferença significativa na ocorrência de NIP médio ou forte entre fêmeas e machos ($p = 0,012$). As fêmeas apresentaram um maior número de infecções parasitárias com valores iguais ou superiores a 500 OPG do que os machos (Gráfico 25).

Gráfico 24 - Nível de infecção parasitária em relação ao sexo.

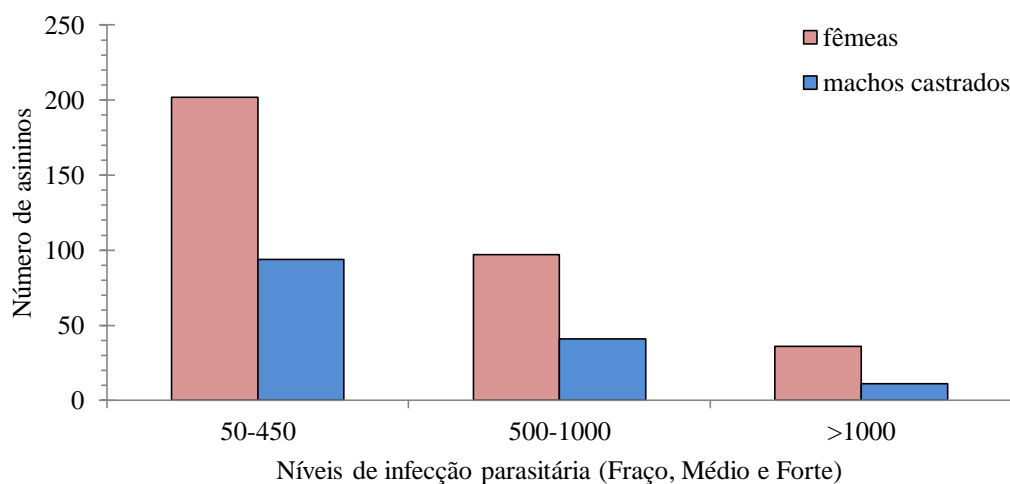
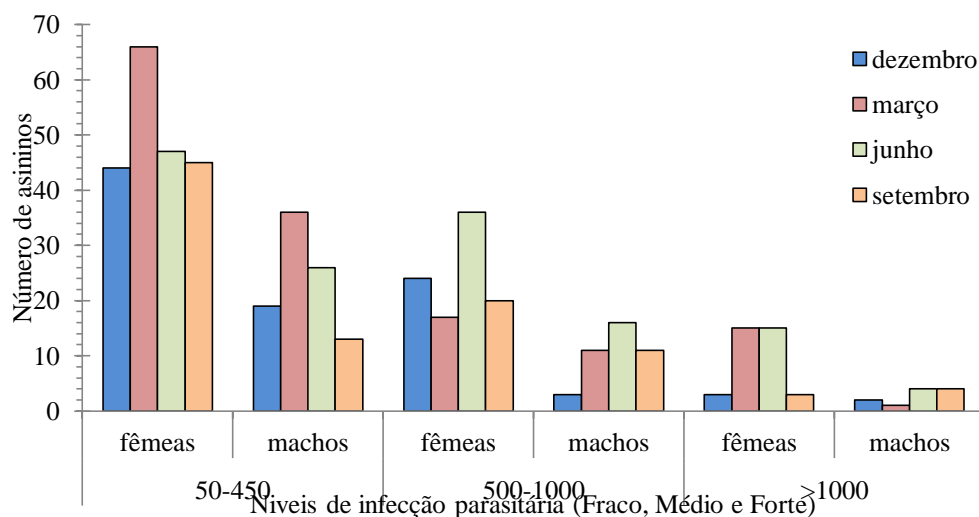
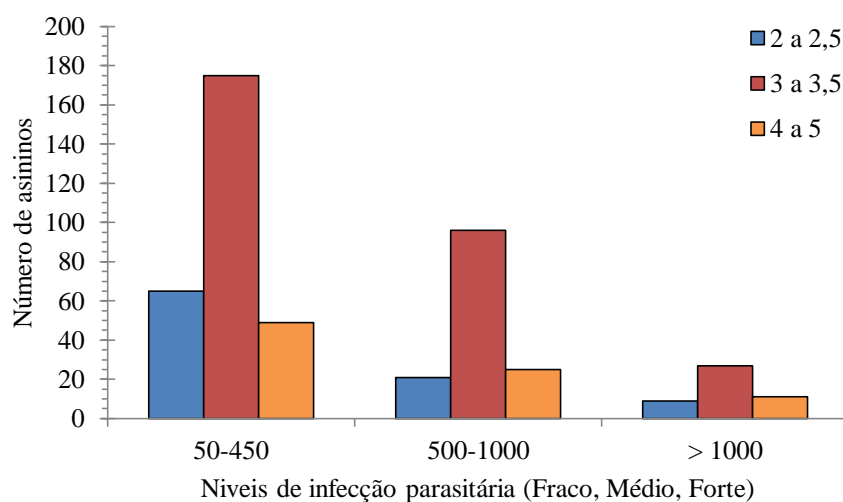


Gráfico 25 - Nível de infecção parasitária em relação ao sexo e meses estudados.



Relativamente ao índice de condição corporal (ICC), verificou-se que em todos os níveis de infecção parasitária houve maior participação de animais com ICC de 3-3,5. No grupo de NIP fraco seguiu-se maior contribuição dos animais com ICC 2-2,5. No grupo de NIP forte seguiu-se a maior contribuição dos animais com ICC 4-5 (Gráfico 26).

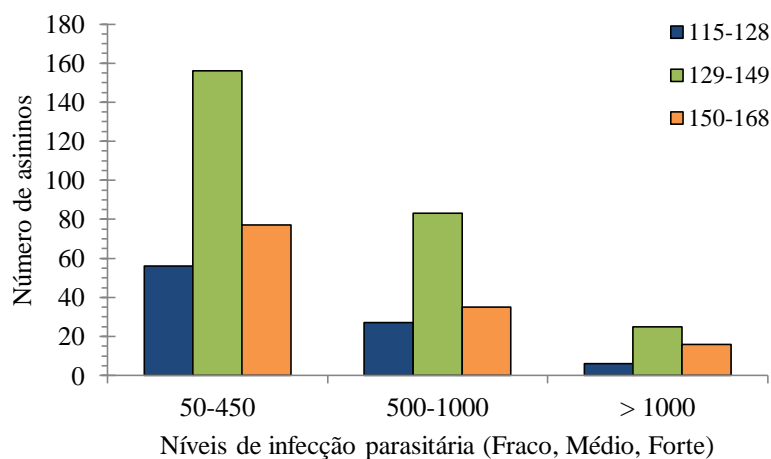
Gráfico 26 - Distribuição do NIP em relação à condição corporal dos animais.



A análise estatística (ANOVA) permitiu observar diferenças estatisticamente significativas entre as três condições corporais e os níveis de infecção parasitária ($p < 0,0001$).

No que respeita ao perímetro torácico, verificou-se que em todos os níveis de infecção parasitária houve maior participação de animais com PTO 130-149cm, seguindo-se os animais com PTO 150-168cm e por fim os animais com PTO 115-128cm (Gráfico 27).

Gráfico 27 - Distribuição do NIP em relação ao perímetro torácico dos animais.



A análise estatística (ANOVA) permitiu observar diferenças estatisticamente significativas entre os três perímetros torácicos considerados e os níveis de infecção parasitária ($p < 0,0001$).

A análise da correlação pelo teste de Spearman, entre o NIP e as variáveis meteorológicas no período de estudo, permitiu observar correlações estatisticamente significativas com a temperatura e com a precipitação em alguns grupos da população.

Em animais com idade superior a dez anos verificou-se a existência de uma correlação positiva entre o NIP médio (500-1000 OPG) e a temperatura média ($\rho = 0,49$; $p < 0,03$).

Em animais de PTO 130-149cm observou-se uma correlação positiva entre a temperatura mínima e NIP médio (500-1000 OPG) ($\rho = 0,44$; $p < 0,05$). Também foi observada uma correlação negativa entre a temperatura mínima e NIP fraco (50-450 OPG) ($\rho = -0,47$; $p < 0,036$).

Em animais de condição corporal 2,5 foi evidenciada uma correlação negativa entre a temperatura mínima e NIP fraco (50-450 OPG) ($\rho = -0,46$; $p < 0,042$). Também neste grupo de animais verificou-se uma correlação negativa entre a temperatura média e NIP fraco (50-450 OPG) ($\rho = -0,46$; $p < 0,043$), entre temperatura máxima e NIP fraco (50-450 OPG) ($\rho = -0,63$; $p < 0,003$). Ainda neste grupo, os animais com idade inferior a quatro anos evidenciaram uma correlação negativa entre a precipitação e NIP forte (> 1000 OPG) ($\rho = -0,45$; $p < 0,045$).

6.3.3. Biodiversidade de parasitas gastrointestinais

Após a realização da coprocultura procedeu-se à identificação das larvas infetantes, sendo possível observar a biodiversidade e avaliar a prevalência (Quadro 15) e abundância proporcional (Quadro 16) de géneros e espécies de parasitas gastrointestinais observados durante o estudo.

A prevalência de infecção parasitária por *Parascaris* foi observada após realização de diagnóstico etiológico, por observação de ovos presentes nas amostras fecais analisadas, pelo método coprológico quantitativo de McMaster.

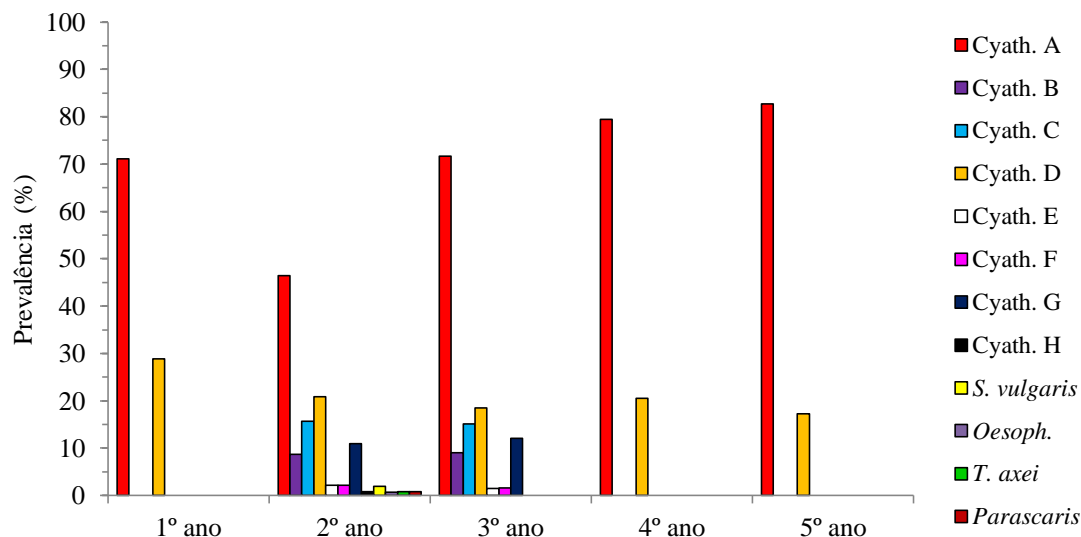
Quadro 15 - Prevalências médias de géneros e espécies de parasitas gastrointestinais observados durante o estudo.

Meses	Strongylidae											
	Cyathostominae								Strongylinae			
	Morfotipos do género <i>Cyathostomum</i>								<i>S. vulgaris</i>	<i>Oesoph.</i>	<i>T. axei</i>	<i>Parascaris</i>
	A	B	C	D	E	F	G	H				
dez-09	71,0	0,0	0,0	29,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
mar-10	71,4	0,0	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
jun-10	69,2	0,0	0,0	30,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
set-10	72,7	0,0	0,0	27,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Média	71,1	0,0	0,0	28,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D. padrão	1,4	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
dez-10	70,0	0,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
mar-11	38,3	7,8	15,6	17,5	1,9	1,9	11,7	0,6	2,6	0,6	0,6	0,6
jun-11	35,0	8,7	16,5	19,4	1,9	1,9	11,7	1,0	1,9	0,0	1,0	1,0
set-11	42,5	9,6	15,1	16,4	2,7	2,7	9,6	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0
Média	46,4	8,7	15,7	20,8	2,2	2,2	11,0	0,8	2,0	0,6	0,8	0,8
D. padrão	16,0	0,9	0,7	6,2	0,5	0,5	1,2	0,2	0,6	0,0	0,2	0,2
dez-11	42,4	9,1	15,2	18,2	1,5	1,6	12,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
mar-12	84,4	0,0	0,0	15,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
jun-12	77,3	0,0	0,0	22,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
set-12	82,6	0,0	0,0	17,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Média	71,7	9,1	15,2	18,5	1,5	1,6	12,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D. padrão	19,7	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
dez-12	78,9	0,0	0,0	21,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
mar-13	78,6	0,0	0,0	21,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
jun-13	79,4	0,0	0,0	20,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
set-13	81,0	0,0	0,0	19,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Média	79,5	0,0	0,0	20,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D. padrão	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
dez-13	77,8	0,0	0,0	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
mar-14	82,4	0,0	0,0	17,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
jun-14	85,0	0,0	0,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
set-14	85,7	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Média	82,7	0,0	0,0	17,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D. padrão	3,6	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Cyath A - *Cyathostomum* morfotipo A; *Cyath B* - *Cyathostomum* morfotipo B; *Cyath C* - *Cyathostomum* morfotipo C; *Cyath D* - *Cyathostomum* morfotipo D; *Cyath E* - *Cyathostomum* morfotipo E; *Cyath F* - *Cyathostomum* morfotipo F; *Cyath G* - *Cyathostomum* morfotipo G; *Cyath H* - *Cyathostomum* morfotipo H; *S. vulgaris* - *Strongylus vulgaris*; *Oesoph.* - *Oesophagodontus robustus*; *T. axei* - *Trichostrongylus axei*; *Parascaris*)

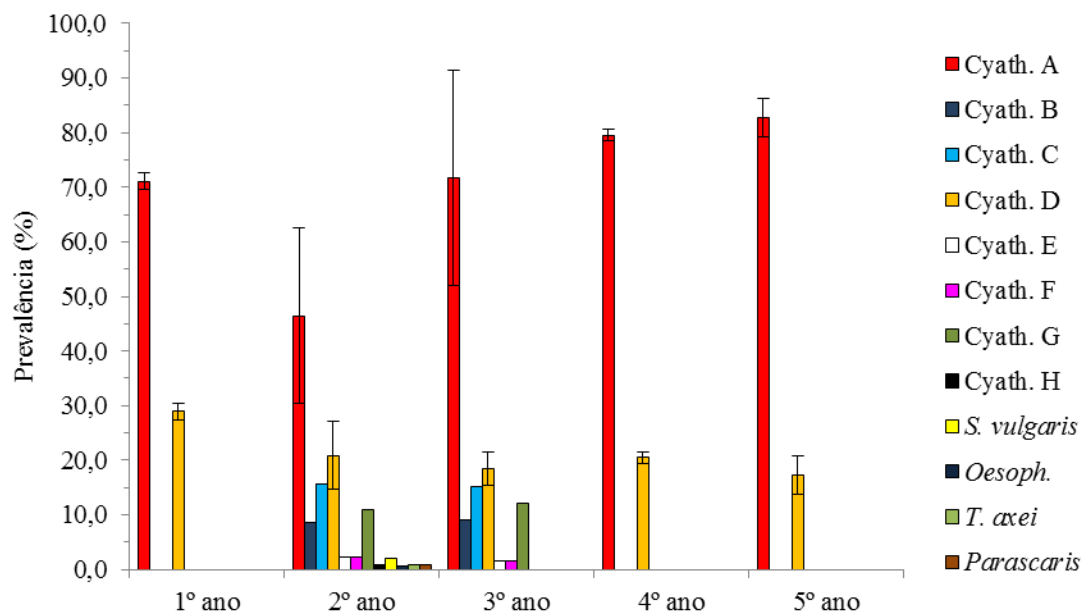
Ao longo dos cinco anos de estudo, com controlo parasitário seletivo trimestral, observou-se uma baixa biodiversidade de parasitas gastrointestinais sendo os cistostomíneos os mais prevalentes (Gráficos 28 e 29).

Gráfico 28 - Prevalências médias anuais de parasitas gastrointestinais, observados ao longo do estudo.



Cyath. A - *Cyathostomum* morfotipo A; Cyath. B - *Cyathostomum* morfotipo B; Cyath. C - *Cyathostomum* morfotipo C; Cyath. D - *Cyathostomum* morfotipo D; Cyath. E - *Cyathostomum* morfotipo E; Cyath. F - *Cyathostomum* morfotipo F; Cyath. G - *Cyathostomum* morfotipo G; Cyath. H - *Cyathostomum* morfotipo H; *S. vulgaris* - *Strongylus vulgaris*; *Oesoph.* - *Oesophagodontus robustus*; *T. axei* - *Trichostrongylus axei*

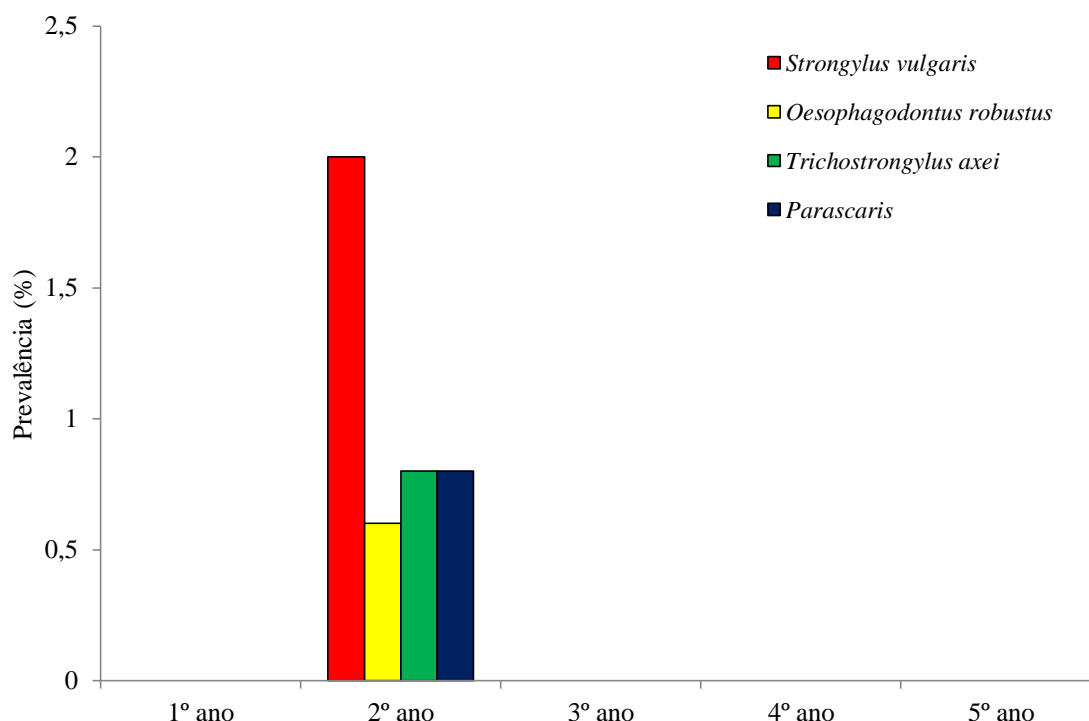
Gráfico 29 - Prevalências médias globais dos parasitas durante o período de estudo (com barra do erro padrão da média).



Cyath. A - *Cyathostomum* morfotipo A; Cyath. B - *Cyathostomum* morfotipo B; Cyath. C - *Cyathostomum* morfotipo C; Cyath. D - *Cyathostomum* morfotipo D; Cyath. E - *Cyathostomum* morfotipo E; Cyath. F - *Cyathostomum* morfotipo F; Cyath. G - *Cyathostomum* morfotipo G; Cyath. H - *Cyathostomum* morfotipo H; *S. vulgaris* - *Strongylus vulgaris*; *Oesoph.* - *Oesophagodontus robustus*; *T. axei* - *Trichostrongylus axei*

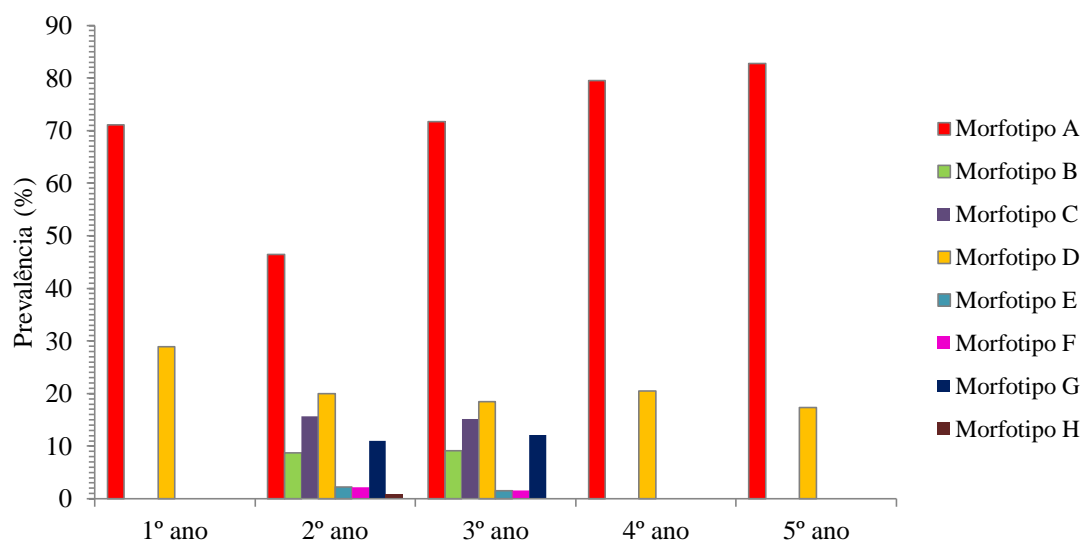
Durante o segundo ano de estudo observou-se um aumento da biodiversidade, surgindo 2,6% de animais parasitados com estrongilíneos, dos quais 2,0% parasitados com a espécie *Strongylus vulgaris*, a espécie de estrongilíneo mais prevalente, e 0,6% por *Oesophagodontus robustus*. Neste período foram observados 0,8% de infecção por *Trichostrongylus axei* e 0,8% pelo género *Parascaris* (Gráfico 30).

Gráfico 30 - Prevalência de parasitas gastrointestinais (não Cyathostominae) observada no segundo ano de estudo.



O género *Cyathostomum sensu lato* foi o único ciatostomíneo observado ao longo dos cinco anos de estudo, sendo mais prevalentes os morfotipos A (35,0 a 85,7%) e D (15,6 a 30,8%). Durante o segundo e terceiro anos de estudo, observou-se uma maior biodiversidade do género *Cyathostomum sensu lato*, sendo os morfotipos A (46,4 a 71,7%), D (20,8 a 18,5%), C (15,7 a 15,2%), G (11,0 a 12,1%) e B (8,7 a 9,1%), os mais observados. Foram menos observados os morfotipos E (2,2 a 1,5%) e F (2,2 a 1,6%). O morfotipo H foi observado apenas no segundo ano de estudo com 0,8% de prevalência (Gráfico 31).

Gráfico 31 - Biodiversidade do género *Cyathostomum sensu lato* observada ao longo dos cinco anos de estudo.



Relativamente ao tratamento estatístico da biodiversidade parasitária, não foi possível estabelecer diferenças estatísticas entre os diferentes géneros e espécies observadas ao longo do estudo. Apenas foi possível analisar os morfotipos A e D do género *Cyathostomum sensu lato* por este ter sido observado de forma constante ao longo do estudo.

A análise da biodiversidade parasitária permitiu observar diferenças estatisticamente significativas do género *Cyathostomum sensu lato* morfotipo A nos animais com idades entre quatro a dez anos e superiores a dez anos ($p=0,041$) e também nos animais com condição corporal entre 2-2,5 e 4-5 ($p=0,028$).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas do género *Cyathostomum sensu lato* morfotipo D entre o grupo dos animais com idade menor que quatro anos e idade maior que dez anos ($p=0,042$), assim como entre os animais com condição corporal 2-2,5 e 3-3,5 ($p=0,04$), 3-3,5 e 4-5 ($p=0,018$) e entre 2-2,5 e 4-5 ($p<0,0001$).

O estudo da abundância de larvas infetantes de géneros e espécies parasitas gastrointestinais permitiu observar um decréscimo do número de larvas identificadas por cultura fecal do primeiro para o último ano do estudo, de 8500 para 5701 larvas, respetivamente, embora tenha ocorrido uma maior abundância de larvas durante o segundo e terceiro anos de estudo (Gráfico 32). Também foi possível observar uma flutuação do número de larvas ao longo do ano, sendo menos abundantes em setembro (9500/47335; 20,1%) e dezembro (9303/47335;

19,7%) e mais em março (14337/47335; 30,3%) e junho (14195/47335; 30,0%) (Gráfico 33).

Gráfico 32 - Registo do valor médio anual global do número de larvas infetantes observadas ao longo dos cinco anos de estudo.

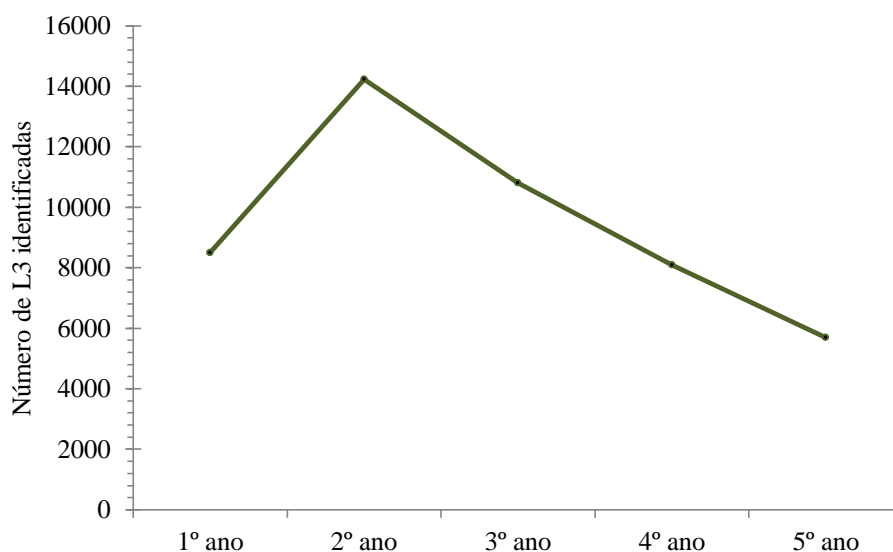
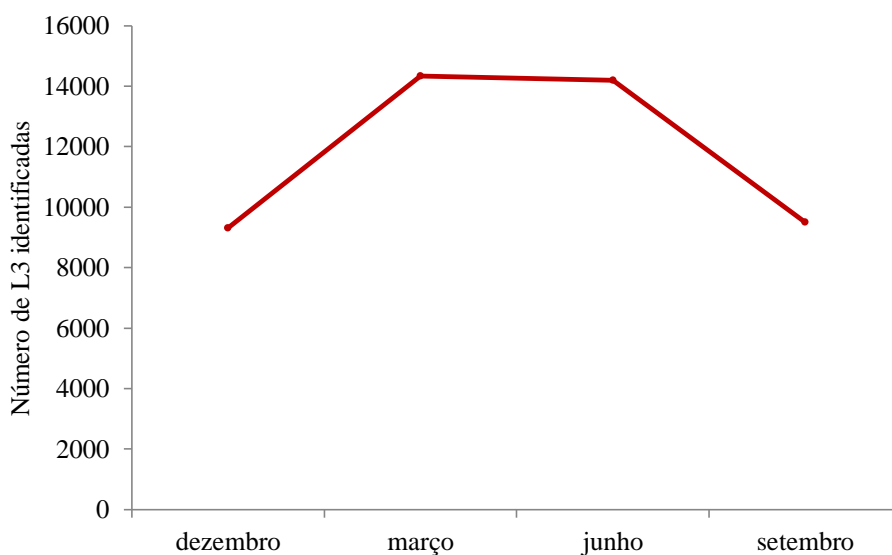


Gráfico 33 - Flutuação anual do número de larvas observada no estudo.



Relativamente à abundância proporcional dos diferentes géneros e espécies, verificou-se que as larvas infetantes de *Cyathostomum sensu lato* foram as mais abundantes, representando cerca de 99,8% das larvas observadas nas amostras positivas analisadas. *Trichostrongylus*

axei (0,19%), *Strongylus vulgaris* (0,02%) e *Oesophagodontus robustus* (0,002%) foram as espécies assinaladas por ordem decrescente de abundância em relação ao total analisado de larvas infetantes, embora com muito menor expressão. Os valores encontram-se expostos no Quadro 16 e Gráficos 34 e 35.

Quadro 16 - Abundâncias proporcionais médias mensais e anuais de géneros e espécies de parasitas gastrointestinais (L3) observados nos asininos estudados.

Meses	Nº L3 Observadas	% de géneros e espécies observados em culturas fecais										
		Strongylidae								Strongylinae		
		Cyathostominae										
		Morfotipos do género <i>Cyathostomum</i>										
		A	B	C	D	E	F	G	H	<i>S. vulgaris</i>	<i>Oesoph.</i>	<i>T. axei</i>
dezembro	9303	91,22	0,08	1,34	7,14	0,01	0,01	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
março	14337	91,50	0,13	1,40	6,03	0,03	0,04	0,38	0,00	0,04	0,01	0,44
junho	14195	90,98	0,09	1,20	7,09	0,02	0,03	0,22	0,01	0,02	0,00	0,34
setembro	9500	93,56	0,08	1,11	5,04	0,02	0,02	0,15	0,00	0,02	0,00	0,00
Média	11833,75	91,81	0,09	1,26	6,33	0,02	0,03	0,24	0,00	0,02	0,002	0,19
Mínimo	9303	90,98	0,08	1,11	5,04	0,01	0,01	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	14337	93,56	0,13	1,40	7,14	0,03	0,04	0,38	0,01	0,04	0,01	0,44
Desvio padrão	2810,27	1,18	0,02	0,14	1,00	0,01	0,01	0,10	0,00	0,02	0,00	0,23

Cyath. A - *Cyathostomum* morfotipo A; *Cyath. B* - *Cyathostomum* morfotipo B; *Cyath. C* - *Cyathostomum* morfotipo C; *Cyath. D* - *Cyathostomum* morfotipo D; *Cyath. E* - *Cyathostomum* morfotipo E; *Cyath. F* - *Cyathostomum* morfotipo F; *Cyath. G* - *Cyathostomum* morfotipo G; *Cyath. H* - *Cyathostomum* morfotipo H; *S. vulgaris* - *Strongylus vulgaris*; *Oesoph.* - *Oesophagodontus robustus*; *T. axei* - *Trichostrongylus axei*)

Gráfico 34 - Abundâncias proporcionais médias dos diferentes morfotipos de *Cyathostomum sensu lato* observados nos asininos estudados.

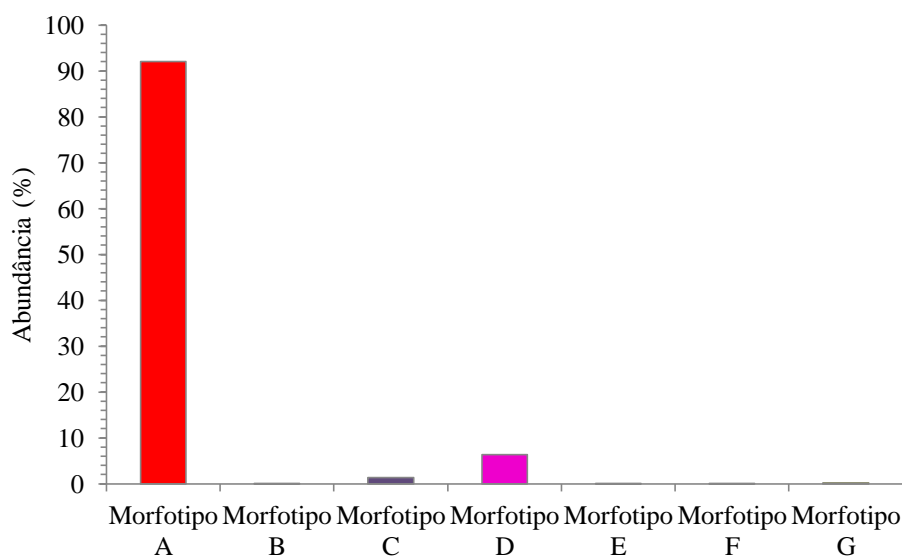
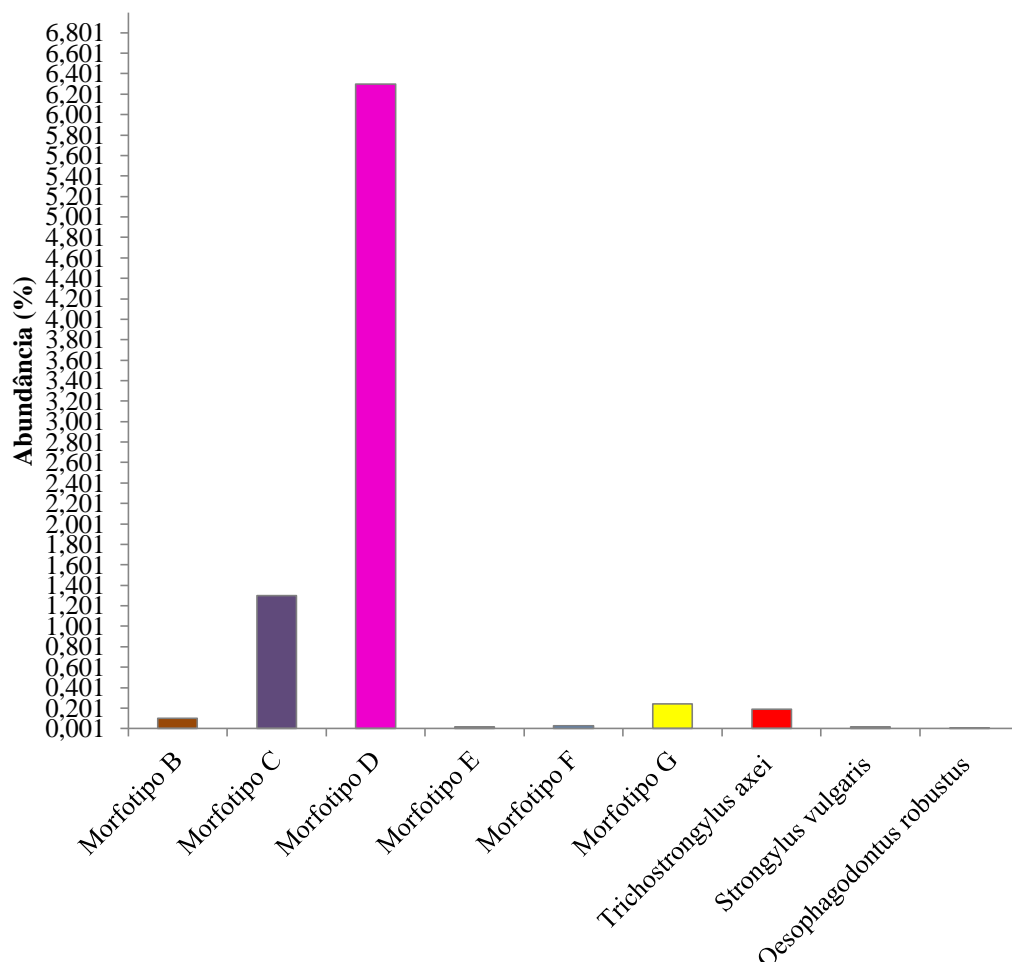


Gráfico 35 - Abundâncias proporcionais médias do gênero *Cyathostomum sensu lato* (morfofotipos B, C, D, E, F e G) e de parasitas gastrointestinais não ciatostomíneos observados.



A análise estatística da abundância de larvas infetantes de gêneros e espécies parasitas gastrointestinais permitiu observar diferença estatística para *Cyathostomum sensu lato* morfofotoipo D entre os meses de junho e setembro durante os cinco anos de estudo ($p=0,039$), observando-se que a abundância de larvas deste parasita no mês de junho é diferente e superior ao da abundância do mês de setembro, ao longo de todos os anos de estudo.

6.4. Estudo da contaminação ambiental por strongilídeos

6.4.1. Estudo da biodiversidade de larvas infetantes de strongilídeos na pastagem

Ao longo de cinco anos de estudo, apenas foram observadas cinco larvas infetantes de *Cyathostomum sensu lato* Morfotipo A em 500 gramas de erva seca em março de 2011 (Quadro 17).

Quadro 17 - Larvas infetantes (L3) de strongilídeos observadas na pastagem durante o período de estudo.

Larvas infetantes de strongilídeos observadas na pastagem					
Meses	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	5º ano
dezembro	0	0	0	0	0
março	0	10 L3/Kg	0	0	0
junho	0	0	0	0	0
setembro	0	0	0	0	0

Por não haver dados suficientes não foi realizado o tratamento estatístico deste resultado.

6.4.2. Estudo da contaminação do estábulo

O estudo da contaminação da palha da cama dos estábulos apenas permitiu observar a presença de ovos de strongilídeos em dezembro de 2009 e dezembro de 2010 (Quadro 18).

Quadro 18 - Ovos de strongilídeos observados na palha da cama do estábulo.

Ovos de strongilídeos observados na cama do estábulo					
Meses	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	5º ano
dezembro	20 OPG	60 OPG	0	0	0
março	0	0	0	0	0
junho	0	0	0	0	0
setembro	0	0	0	0	0

O estudo da contaminação das camas revelou uma baixa contaminação de ovos por grama de palha. Não foi possível realizar o tratamento estatístico destes resultados.

A pesquisa de ovos de strongilídeos na palha e feno utilizado na alimentação dos asininos revelou resultados negativos, não se observando formas parasitárias ao longo do período de estudo.

7. DISCUSSÃO

Este estudo epidemiológico permitiu observar o estatuto parasitológico dos burros da Raça Asinina de Miranda, pertencentes à Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino (AEPGA) e utilizados em programas de recuperação desta raça autóctone.

Estudos realizados entre 2005 e 2008 observaram a infeção parasitária natural deste núcleo de animais sujeitos a um controlo anti-helmíntico estratégico. Este controlo baseou-se em tratamentos de grupo com administração subcutânea de ivermectina a 2% (1ml/50Kg PV) em intervalos regulares. Considerando a primavera e outono as épocas indicadas para o tratamento parasitário, esta população foi sujeita a um protocolo de tratamento estratégico, que consistiu na aplicação de duas doses da lactona macrocíclica nestas épocas. Em 2005, a primeira avaliação parasitológica destes animais permitiu observar uma elevada prevalência de infeção por *strongilídeos* intestinais (87,0%; 110/127) sendo que 70,9% dos asininos apresentavam um nível de infeção parasitária (NIP) forte (>1000 OPG) dos quais 14,5% intensamente parasitados (>5000 OPG). Durante quatro anos, entre 2005 e 2009, o controlo antiparasitário estratégico foi monitorizado duas vezes por ano aquando do tratamento parasitário, através de uma avaliação parasitológica dos animais. Entre 2005 e 2006 registou-se uma diminuição da prevalência média de infeção por *strongilídeos* de 87,0% (2005) para 40,5% (2006) e durante os restantes dois anos foi observada uma manutenção dos valores médios da prevalência em 38,7% (2007), 38,8% (2008). Em 2008, ano anterior ao atual estudo epidemiológico, observou-se uma prevalência de infeção de apenas 38,8% (33/85) em que 81,8% dos asininos parasitados apresentaram eliminação inferior a 1000 OPG, e apenas 18,2 % apresentaram uma eliminação superior a 1000 e inferior a 2500 OPG (Sousa *et al.*, 2008). Com o controlo estratégico foi também evidenciada uma diminuição da biodiversidade parasitária associada a um aumento da prevalência de infeção por *ciatostomíneos*, de 85,2% para 100% com predominância de *Cyathostomum* morfotipo A (100%) e *Cyathostomum* morfotipo D (40%) (Sousa & Madeira de Carvalho, 2009)

Com a manutenção de uma prevalência média de infeção por *strongilídeos* de 39,3% e o aumento da prevalência de infeção por *ciatostomíneos* para 100%, observados na população de asininos da Raça de Miranda sujeita a tratamento estratégico durante os três anos anteriores a este estudo epidemiológico, foi considerada uma nova abordagem ao controlo. Para o efeito foi tido em consideração que a abordagem tradicional de controlo anti-helmíntico estratégico, baseada em tratamentos frequentes, com administrações de anti-helmínticos em intervalos regulares, contribuiu para um controlo pouco eficaz e para o desenvolvimento de resistências

em vários pontos do globo, inclusive em asininos (Lloyd *et al.*, 2000; Kaplan, 2002, 2004; Nielsen, 2009; Canever *et al.*, 2013; Lester *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2013, 2014; Relf *et al.*, 2014). Desta forma, foi proposta à AEPGA a alteração da estratégia de controlo parasitário com o objetivo de utilizar de forma racional os recursos disponíveis e de desparasitar apenas os animais com indicação para tratamento, evitando administrações desnecessárias ou ineficazes.

Em dezembro de 2009, no início deste estudo epidemiológico, foi implementado o controlo seletivo, baseado na vigilância do parasitismo com seleção de tratamentos anti-helmínticos específicos para os asininos da AEPGA, no solar da Raça de Miranda.

Durante o período de estudo foram monitorizados todos os asininos e selecionados para tratamento apenas os animais eliminadores de valores iguais ou superiores a 500 OPG, tendo sido observada, em comparação com o controlo estratégico anteriormente utilizado, uma redução do número dos tratamentos anti-helmínticos com administração subcutânea de ivermectina a 2% (1ml/50Kg PV). Durante os cinco anos de estudo, observou-se um número médio de desparasitações de 3,3 nas fêmeas e de 2,7 nos machos, com um intervalo médio entre desparasitações de 16,2 meses nas fêmeas e de 22,4 meses nos machos. Estes resultados parecem estar de acordo com Trawford & Burden (2012), que referem que a monitoração frequentemente de asininos permite programas de tratamento individualizado e por Nielsen *et al.* (2006, 2014) e Becher *et al.* (2010), autores que observaram uma redução do número de tratamentos com anti-helmínticos com a abordagem de controlo seletivo.

Ao longo de cinco anos de estudo foi observada uma diminuição da prevalência média anual de 35,1% para 23,0%, verificando-se no final do estudo uma convergência para uma taxa de prevalência de 19,9%. Estes valores são coincidentes com os observados na bibliografia que refere uma distribuição do tipo binominal negativa, em que cerca de 20% dos hospedeiros concentram cerca de 80% dos estrongilídeos, parasitas de equídeos (Warnick, 1992; Molnar & Kassai, 1994; Nielsen *et al.*, 2006). Estudos recentes demonstram que a percentagem real de equídeos, responsável pela excreção de 80% da carga parasitária no ambiente é inferior a 20% da população (Lester *et al.*, 2013; Relf *et al.*, 2013).

Desta forma verificou-se que o controlo parasitário seletivo observado ao longo deste estudo, foi eficaz para no controlo do parasitismo por estrongilídeos, em concordância com estudos realizados em equídeos e referidos por vários autores (Nielsen *et al.*, 2006; Becher *et al.*, 2010; Francisco *et al.*, 2012; Trawford & Burden, 2012; Greite, 2013; Madeira de Carvalho *et al.*, 2014; Nielsen *et al.*, 2014).

Contudo, fatores extrínsecos como o manejo e condições meteorológicas, assim como fatores intrínsecos aos asininos como a idade, sexo, condição corporal e tamanho do animal, parecem influenciar o controlo parasitário seletivo.

Durante o segundo ano de estudo, entre dezembro de 2010 e setembro de 2011, observou-se um aumento da prevalência média anual de 35,1% para 58,5%, com um valor mensal máximo de 98,4% registado em março de 2011. A caracterização climática do Planalto Mirandês e da área de dispersão da Raça Asinina de Miranda, realizada durante o período de estudo, permitiu observar uma diminuição acentuada da precipitação. Segundo os registos do Boletim Climatológico Mensal de Portugal Continental, do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, o ano de 2011 foi seco, com uma precipitação média anual de apenas 59,5mm, sendo julho o mês mais seco (1,1mm) e setembro o mais chuvoso (136,8mm).

Considerando que o regime fluvial dos cursos de água do Planalto Mirandês depende da sazonalidade climática da região (Monteiro *et al.*, 2000; Meirinhos, 2014) e que o tradicional método de rega de lima utilizado nos lameiros, que desempenha um papel regulador do ciclo da água e dos nutrientes do solo, pode ser interrompido nos anos mais secos quando os cursos de água secam por completo (Moreira *et al.*, 2001; Pôças, 2014), torna evidente a importância das condições geoclimáticas na manutenção da composição florística da vegetação espontânea característica dos lameiros ou pastagens de montanha, sendo a disponibilidade hídrica um elemento crítico para a existência de pastagem (Méndez & Aguiar, 2010).

Pelo facto dos lameiros constituírem a base da alimentação de ruminantes e equídeos domésticos do Planalto Mirandês e de estes permanecerem em pastoreio conjunto (Monteiro *et al.*, 2000; Méndez & Aguiar, 2010; AEPGA, 2015a), a escassez de alimento pode alterar o comportamento natural dos asininos que passam a alimentar-se junto ou dentro das áreas de defecação, aumentando a contaminação ambiental e consequentemente o risco de reinfeção e infeção de outros animais. Nestas condições os asininos podem acumular um grande número de estrongilídeos (Kuzmina, 2012; Matthews & Burden, 2013; Relf *et al.*, 2013; Matthews, 2008, 2014; Schneider *et al.*, 2014). Por outro lado, estudos demonstram que o pastoreio conjunto, de equinos domésticos e bravios, promove o aumento do parasitismo dos animais introduzidos, os que apresentam valores de excreção de ovos superiores (Madeira de Carvalho, 2001).

Arneberg *et al.*, (1998), Madeira de Carvalho (2001) e Matthews & Burden (2013) consideram que o encabeçamento é crítico para o controlo do parasitismo em equídeos, observando maior infeção parasitária em populações com maior encabeçamento. Segundo Patterson & Ruckstuhl (2013) a prevalência e a intensidade do parasitismo estão diretamente relacionadas com a densidade dos hospedeiros.

A contaminação ambiental observada na palha, nos meses de dezembro de 2009 (20 OPG) e dezembro 2010 (60 OPG), assim como a observada na pastagem em março de 2011 (10 L3/Kg) pode estar relacionada com o pico de parasitismo observado durante o segundo ano de estudo. Segundo Uhlinger (1991) e Döpfer *et al.* (2004), a média da contagem dos ovos emitidos pelos elementos de um rebanho permite calcular o ritmo de infecção adquirida pelos equídeos, assim como o grau de contaminação do meio ambiente, com ovos dos parasitas.

Neste estudo epidemiológico foram observados diferentes valores de taxa de prevalências de infecção por *estrongilídeos* em asininos. Quanto ao sexo, foi observada uma prevalência superior em fêmeas (39,5%) do que em machos (37,1%). Em asininos de diferentes faixas etárias observou-se maior prevalência em animais com idade inferior a quatro anos (46,7%) e menor em animais com idade superior a dez anos (35,6%). Entre asininos de diferentes condições corporais, foi observada maior prevalência de infecção em asininos com menor condição corporal (40,8%) do que asininos com melhor condição corporal (35,8%). Desta forma este estudo permitiu identificar o sexo, a idade e a condição corporal como fatores de risco para a infecção parasitária por *estrongilídeos*, revelando maior intensidade de infecção por *estrongilídeos* em asininos do sexo feminino, com idade inferior a quatro anos e em menor condição corporal, resultados coincidentes com os referidos por vários autores (Bell *et al.*, 2001; Tesfu *et al.*, 2014).

O aumento de parasitismo observado no segundo e terceiro anos de estudo, terá ocorrido devido ao aumento da prevalência de infecção e aumento da excreção de ovos registados nos animais mais jovens e nas fêmeas.

No grupo de animais com idade inferior a quatro anos ocorreu um pico de excreção no segundo ano (901,6 OPG) e no terceiro (709,0 OPG), coincidindo com o pico de excreção de ovos observado nestes anos (1150,0 e 707,4 OPG, respetivamente no segundo e terceiro ano de estudo). Em relação ao sexo, durante o período de estudo não foram observadas diferenças significativas entre a taxa de prevalência de fêmeas (39,5%) e machos (37,1%), assim como entre média global do valor de OPG excretados pelas fêmeas (564,5 OPG) e pelos machos (520,3 OPG). No entanto a média da frequência de novas infecções foi superior em fêmeas (6,9) do que em machos (2,6) assim como a média de excreção de ovos observada durante o período mais seco do estudo, em que as fêmeas apresentaram valores médios de 779,9 OPG e 660,7 OPG, e os machos de 554,5 OPG e 502,3 OPG, no segundo e terceiro anos, respetivamente.

Este estudo permitiu observar a maior suscetibilidade dos asininos jovens assim como das fêmeas às infecções parasitárias por *estrongilídeos*, referida por vários autores (Bell *et al.*,

2001; Mezgebu *et al.*, 2013; Tesfu *et al.*, 2014; Sheferaw & Alemu, 2015; Tsegaye & Chala, 2015).

Segundo os resultados deste estudo, a condição corporal, avaliada pelo perímetro torácico, parece não ter relação com a taxa de prevalência de infecção. Este resultado poderá estar relacionado com a uniformidade morfométrica observada na população estudada.

Este estudo permitiu observar uma curva anual de excreção de ovos de *estrongilídeos* parasitas de asininos da Raça de Miranda, no Planalto Mirandês. A flutuação observada caracteriza-se por um padrão sazonal de excreção de ovos verificando-se um aumento progressivo desde dezembro até junho, mês que se atinge um pico máximo na eliminação de ovos; decrescendo depois progressivamente a excreção nos meses de setembro até dezembro.

No nosso país foi observada uma curva semelhante por Madeira de Carvalho (2001), em garranos bravios do Parque Natural Peneda Gerês. Também foi referido um padrão sazonal, de excreção de ovos de *estrongilídeos* parasitas de equinos, similar no noroeste de Espanha (Vázquez, 2010). O aumento sazonal da excreção de ovos de *estrongilídeos* parasitas de equinos, com contagens mais elevadas no verão e mais baixas no inverno, tem sido referido em vários estudos realizados em países do hemisfério norte como no Reino Unido (Ramsey *et al.*, 2004; Lloyd & Martin, 2006), na Ucrânia (Kuzmina *et al.*, 2006b) e Estados Unidos (Baudena *et al.*, 2000). A dinâmica populacional dos *estrongilídeos* depende das condições ambientais que condicionam as épocas de ovopostura, em particular dos *ciatostomíneos*. Quando as condições ambientais são desfavoráveis no hemisfério norte, durante os meses de dezembro a março, as larvas de *ciatostomíneos* encontram-se em hipobiose encapsuladas na mucosa e submucosa do intestino grosso, atrasando o desenvolvimento endógeno até à fase adulta. A baixa excreção de ovos de *ciatostomíneos* observada de dezembro a março, época de condições ambientais extremas e desfavoráveis ao desenvolvimento exógeno, parece evidenciar a presença de *estrongilídeos* adultos pouco viáveis no lúmen do intestino grosso e a duração da fase de hipobiose (Elsener & Villeneuve, 2009; Corning, 2009). No fim do inverno ou início da primavera os *estrongilídeos* adultos são eliminados e as larvas hipobióticas emergem para o lúmen do intestino grosso (Giles *et al.*, 1985; Reinemeyer *et al.*, 1986).

A curva anual de excreção de ovos de *estrongilídeos* parasitas de asininos da Raça Asinina de Miranda, no Planalto Mirandês observada neste estudo, poderá corresponder assim ao ciclo anual da dinâmica de população de *ciatostomíneos* descrito para equinos no hemisfério norte.

A curva anual de excreção de ovos observada poderá ser consequência das condições meteorológicas registadas no Planalto Mirandês onde são observadas condições favoráveis para o desenvolvimento do ciclo exógeno de *estrongilídeos* durante os meses de março a

junho. Segundo Soulsby (1986) e Mfitilodze & Hutchinson (1987) a L1 pode desenvolver-se entre os limites mínimo (3°C) e máximo (40°C), podendo eclodir e sobreviver durante várias semanas a temperaturas baixas (8°C) e originar larvas viáveis ao fim de dez meses.

No Planalto Mirandês registam-se temperaturas mínimas (8°C) favoráveis ao desenvolvimento dos ovos de *strongilídeos* a partir de março, o que poderá justificar um aumento da população de L3 na pastagem em abril, um mês após ao pico de eliminação, e a ocorrência do pico máximo de excreção de ovos em junho. Como os meses mais quentes registam temperaturas máximas absolutas próximas a 40°C, condições desfavoráveis ao desenvolvimento exógeno de *strongilídeos*, ocorre uma diminuição da excreção de ovos.

Desta forma os resultados obtidos parecem estar de acordo com as condições climáticas definidas por Monteiro *et al.* (2000), Preto & Sá (2007) e Meirinhos (2014), que referem uma continentalidade do Planalto Mirandês, zona de Trás-os-Montes de menor influência atlântica caracterizada por fortes amplitudes térmicas, com verões quentes e curtos e os invernos frios e longos.

Este estudo registou a ocorrência de uma curva de excreção de ovos caracterizada por aumento lento e progressivo do número de ovos eliminados pelas fezes, de 0 a 450 OPG, observado ao longo de cinco anos, sem ter havido indicação para tratamento anti-helmítico. Esta curva foi observada num asinino macho esterilizado com idade entre 15 a 20 anos, perímetro torácico de 159 centímetros e nível três de condição corporal.

Sendo um animal adulto e sujeito a um contacto continuado com formas infetantes, os valores de OPG baixos observados podem indicar um certo grau de pré-munição (Madeira de Carvalho, 2001). Por outro lado, alterações comportamentais relacionadas com dominância ou com apetência por alimentos desidratados, como feno e palha, em detrimento da pastagem, poderão justificar esta curva de excreção de ovos que reflete níveis muito baixos de infeção parasitária. No entanto, do ponto de vista epidemiológico, os animais excretores de baixos valores de OPG podem assumir um papel muito importante como fonte de refúgio e consequentemente na prevenção do aparecimento de resistências a anti-helmíticos. Apesar de não existirem estudos quantitativos que fundamentem estes princípios, os autores referem que os nematodes parasitas dos equídeos não tratados podem atuar como uma fonte de refúgio que desempenha um papel central no desenvolvimento de resistência aos anti-helmíticos (Van Wyk, 2001; Bowman *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2006; Van Wyk *et al.*, 2006; KENYON *et al.*, 2009). Os autores supõem que o pequeno número de nematodes resistentes sobreviventes ao tratamento dos equídeos possam ser rapidamente diluídos pelos parasitas em refúgio, levando a uma acumulação lenta na população de alelos genéticos que codificam para

a resistência aos anti-helmínticos (Eysker *et al.*, 2006; Van Wyk *et al.*, 2006; Matthews *et al.*, 2014).

Segundo os vários autores consultados, as infecções parasitárias são frequentes em asininos. Estes referem resultados similares aos observados neste trabalho, com níveis de infecção elevados por strongilídeos intestinais, de 82,0 a 90,0% (Mattioli *et al.*, 1994; Wells *et al.*, 1998; Gebread, 1999; Collobert-Laugier *et al.*, 2002; Matthee *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2004).

No presente estudo observou-se uma baixa biodiversidade, de parasitas gastrointestinais, associada ao controlo parasitário seletivo, sendo os ciatostomíneos os mais prevalentes ao longo dos cinco anos de estudo. Este resultado é coincidente com os referidos por vários autores, que observam uma prevalência de ciatostomíneos próxima dos 100% (Madeira de Carvalho, 2001; Matthee *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2006; Kuzmina *et al.*, 2007; Kuzmina & Kuzmin 2008; Hosseini *et al.*, 2009; Getachew *et al.*, 2010; Chitra *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2014) e uma baixa biodiversidade associada a controlos parasitários (Becher *et al.*, 2010; Nielsen, 2012; Trawford & Burden, 2012; Menzel, 2013).

A infecção por ciatostomíneos observada neste trabalho pode representar algum risco acrescido para a saúde dos asininos, por estes parasitas exercerem um impacto negativo na saúde, reduzindo significativamente a sua condição corporal (Matthee, *et al.*, 2002b; Lind *et al.*, 2003; Peregrine *et al.*, 2006) assim como por estarem associados a situações de colite grave, diarreia crónica ou mortalidade até 50% em equídeos (Lyons *et al.*, 2000; Love, 2003). Por outro lado, pode representar um desafio na abordagem de controlo antiparasitário, visto que estes parasitas encontram-se associados à resistência anti-helmíntica emergente a todos os grupos de compostos sintéticos disponíveis para tratamento anti-helmíntico de equídeos (Becher *et al.*, 2010; Nielsen, 2012; Trawford & Burden, 2012; Menzel, 2013).

O género *Cyathostomum sensu lato* foi o único género de ciatostomíneo observado ao longo dos cinco anos de estudo, sendo mais prevalentes os morfotipos A (35,0 a 85,7%) e D (15,6 a 30,8%), no entanto durante o segundo e terceiro anos de estudo observou-se uma maior biodiversidade do género *Cyathostomum sensu lato*, com os morfotipos A (46,4 a 71,7%), D (20,8 a 18,5%), C (15,7 a 15,2%), G (11,0 a 12,1%) e B (8,7 a 9,1%), os mais observados, sendo também identificados os morfotipos E (2,2 a 1,5%), F (2,2 a 1,6%) e H (0,8%). Estes resultados são semelhantes aos de Madeira de Carvalho *et al.* (2007c), que observaram uma elevada prevalência de *Cyathostomum sensu lato* em asininos e híbridos estabulados, registando uma grande biodiversidade deste género em equídeos não desparasitados. *Cyathostomum* tipo A foi frequentemente observado, com 65 a 98% de abundância, seguido pelos morfotipos C e D, entre 6 a 8%, e os morfotipos B, E, F, G e H foram os menos

frequentemente observados. Segundo Madeira de Carvalho *et al.* (2007c) e Sousa & Madeira de Carvalho (2009), as medidas de controlo antiparasitário diminuem a biodiversidade deste género.

A prevalência média de infeção por *Strongylus vulgaris* resultou de 2,0% no segundo ano de estudo, sendo o estrongilíneo mais observado. Resultado coincidente com trabalhos prévios que referem *Strongylus vulgaris* como a espécie de estrongilíneo mais prevalente nos seus estudos Getachew *et al.* (2010), Ibrahim *et al.* (2011), Filho *et al.* (2013), Ferreira *et al.* (2014), Matto *et al.* (2015).

Em março de 2011, um asinino macho reprodutor de seis anos, pertencente à AEPGA, surgiu parasitado com 300 OPG. Sem indicação para tratamento anti-helmítico, considerado apenas para animais excretadores de valores iguais ou superiores a 500 OPG, procedeu-se à cultura fecal e identificação das larvas infetantes. Sendo observadas L3 *Strongylus vulgaris* foi aconselhado o tratamento pela importância patogénica deste agente.

De acordo com Pandey (1981), Khallaayoune (1991) e Borji *et al.* (2014), as larvas de *Strongylus vulgaris* são frequentemente observadas em artérias mesentéricas de asininos necropsiados. Borji *et al.* (2014) refere a ocorrência de arterite parasitária, com obstrução completa da artéria mesentérica cranial, pela presença de larvas de *Strongylus vulgaris* assim como cólica severa e fatal de um asinino macho com oito anos de idade, não sujeito a tratamento anti-helmítico regular.

A ocorrência desta infeção parasitária no único animal reprodutor da AEPGA observado neste estudo, levantou a questão colocada pelos autores Nielsen *et al.* (2006, 2012), Becher *et al.* (2010), Pilo *et al.* (2012), Studzińska *et al.* (2012), e Hertzberg *et al.* (2014), que observaram um aumento da prevalência de infeção por *Strongylus vulgaris* em explorações onde se reduziu a intensidade de tratamento anti-helmítico ao longo de vários anos, pelo que os autores consideram que o controlo seletivo poderá aumentar a probabilidade de *Strongylus vulgaris* completar seu ciclo biológico e potenciar o seu reaparecimento. No entanto Hertzberg *et al.* (2014) e Matthews (2014) consideram que são necessários mais estudos para avaliar esta possibilidade.

Durante o segundo ano de estudo foi observada uma prevalência média de infeção por *Trichostrongylus axei* de 0,8%, correspondendo a um macho castrado com seis anos de idade. A ocorrência de infeção de asininos por *Trichostrongylus axei* poderá evidenciar pastoreio conjunto destes animais com ruminantes, uma vez que esta associação tem sido frequentemente referenciada na bibliografia (Madeira de Carvalho & Afonso-Roque, 1995; Trawford & Mulugeta, 2008). De acordo com o observado neste estudo, também Wannas *et*

al. (2012) e Filho *et al.* (2013), referem a ocorrência de infecção gástrica por este parasita em animais adultos entre os dois e os seis anos de idade.

Este estudo evidenciou a ocorrência de uma prevalência média de infecção por *Parascaris* de 0,8%, correspondendo a uma fêmea com oito anos de idade durante o segundo ano de estudo. Getachew (2006), Getachew *et al.* (2010), Chitra *et al.* (2011), Wannas *et al.* (2012), Mezgebu *et al.* (2013) e Tsegaye & Chala, (2015) evidenciaram infecções de asininos adultos, com idade superior a dois anos e meio, por *Parascaris equorum* o que segundo Trawford & Mulugeta (2008) poderá sugerir a ausência de imunidade protetora contra a infecção por ascarídeos em asininos adultos.

Embora ainda seja reduzida a informação sobre a biodiversidade de parasitas gastrintestinais em asininos assim como a sua distribuição na população hospedeira, prevalência de infecção e modo de transmissão, o seu conhecimento é necessário e importante para que se possa adotar medidas terapêuticas adequadas. Este estudo pretende contribuir para o conhecimento de aspetos epidemiológicos importantes para que possam ser utilizados em estratégias de controlo parasitário da população de asininos do Planalto Mirandês, contribuindo desta forma para o estudo e proteção do gado asinino em particular da Raça Asinina de Miranda.

IV. CONCLUSÕES

1. Os inquéritos epidemiológicos permitiram caracterizar a população estudada de asininos da Raça de Miranda, assim como o clima do solar da raça observado durante o período de estudo.

A população de asininos residentes nos centros da AEPGA, caracterizou-se por ser um núcleo de animais utilizados em atividades relacionadas com a preservação da Raça Asinina de Miranda. Permanecendo em regime de semi-estabulação, com acesso permanente à pastagem, estes animais deslocaram-se frequentemente entre os três centros da AEPGA assim como para o exterior dos centros, partilhando espaços e pastagens com outros equídeos, ruminantes e restantes animais domésticos provenientes de explorações agropecuárias tradicionais do Planalto Mirandês.

A população estudada caracterizou-se ainda por ser constituída por um maior número de fêmeas reprodutoras (67,7%) e de machos esterilizados (30,7%), do que machos reprodutores (1,6%); evidenciando uma grande uniformidade de animais adultos (9,1 anos) com um índice de condição corporal médio de 3,2 e perímetro torácico de 141,3 centímetros.

A caracterização climática da região em estudo, realizada através dos registos mensais da estação meteorológica de Bragança (IPMA) ao longo do período de estudo, permitiu observar uma sazonalidade climática caracterizada por períodos frios e húmidos, com valores médios de temperaturas (4,9°C) e precipitação (139,3mm) registados durante os meses de dezembro, janeiro e fevereiro, e períodos quentes e secos, com valores médios de temperaturas (22,0°C) e precipitação (14,6mm) registados durante os meses de julho e agosto.

2. Avaliação da mudança do controlo parasitário estratégico vs. seletivo:

A implementação do controlo seletivo permitiu utilizar os recursos disponíveis de forma mais racional, tratando apenas os animais com indicação para tratamento, eliminadores de valores igual ou superiores a 500 OPG. O controlo seletivo permitiu reduzir o número de tratamentos anti-helmínticos com administração subcutânea de ivermectina a 2% (1ml/50Kg PV), evitando os tratamentos desnecessários ou ineficazes realizados duas vezes por ano, na primavera e outono, observados no controlo estratégico anteriormente aplicado ao grupo de asininos estudados. Durante os cinco anos de estudo, observou-se um número médio de desparasitações de 3,3 nas fêmeas e de 2,7 nos machos, com um intervalo médio entre desparasitações de 16,4 meses nas fêmeas e de 22,4 meses nos machos. Observou-se ainda

uma diminuição da prevalência média anual de 35,1% para 23,0%, evidenciando uma eficácia efetiva do controlo seletivo vs. controlo estratégico.

3. O estudo do parasitismo por strongilídeos parasitas gastrointestinais de asininos evidenciou:

- Uma distribuição do tipo binominal negativa dos strongilídeos parasitas intestinais de asininos, em que cerca de 23,0% dos asininos regularmente desparasitados, concentram a totalidade dos strongilídeos parasitas de asininos.
- O papel epidemiologicamente relevante que os lameiros, ou pastagens de montanha, constituem na epidemiologia das strongilidoses asininas no Planalto Mirandês. Pelo facto dos lameiros constituírem a base da alimentação de ruminantes e equídeos domésticos da região.
- A influência da sazonalidade climática da região na epidemiologia das strongilidoses asininas. Este estudo permitiu observar uma curva anual de excreção de ovos de strongilídeos parasitas de asininos da Raça de Miranda, no Planalto Mirandês. A flutuação observada caracteriza-se por um padrão sazonal de excreção de ovos verificando-se um aumento progressivo desde dezembro até junho, mês que se atinge um pico máximo na eliminação de ovos; decrescendo depois progressivamente a excreção nos meses de setembro até dezembro.
- Fatores de risco para a infeção parasitária por strongilídeos. Este estudo observou maior intensidade de infeção por strongilídeos em asininos do sexo feminino, com idade inferior a quatro anos e em menor condição corporal. Evidenciado o sexo, idade e condição corporal como fatores de risco na epidemiologia das strongilidoses asininas.
- Maior suscetibilidade dos asininos jovens e das fêmeas às infeções parasitárias.
- Uma baixa biodiversidade, de parasitas gastrointestinais, associada ao controlo parasitário seletivo, sendo os ciatostomíneos os mais prevalentes ao longo dos cinco anos de estudo.
- A biodiversidade do género *Cyathostomum sensu lato* foi progressivamente reduzida. Ao longo dos cinco anos de estudo foram mais prevalentes os morfotipos A (35,0 a 85,7%) e D (15,6 a 30,8%), no entanto observou-se durante o segundo e terceiro anos de estudo os morfotipos C (15,7 a 15,2%), G (11,0 a 12,1%) e B (8,7 a 9,1%), E (2,2 a 1,5%), F (2,2 a 1,6%) e H (0,8%).
- Uma prevalência média de infeção por *Strongylus vulgaris* de 2,0%, observada no segundo ano de estudo, sendo o strongilíneo mais observado neste estudo.
- Uma prevalência média de infeção por *Trichostrongylus axei* de 0,8%, observada durante o

segundo ano de estudo, evidenciando pastoreio conjunto destes animais com ruminantes.

Sendo hospedeiros naturais de parasitas intestinais do cavalo e de ruminantes, os asininos podem assumir um papel importante, como hospedeiros assintomáticos disseminadores, na transmissão de infecções parasitárias entre as diferentes espécies de equídeos e a ruminantes.

- Uma prevalência média de infecção por *Parascaris* de 0,8%, correspondendo à infecção parasitária de uma fêmea com oito anos de idade, observada no segundo ano de estudo, sugerindo a ausência de imunidade protetora contra a infecção por ascarídeos em asininos adultos.

4. A contaminação ambiental observada neste trabalho, em dezembro de 2009 e de 2010, poderá estar relacionada com o pico de parasitismo observado durante o segundo ano de estudo.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abayneh, T., Gebreab, F., Zekarias, B., Tadesse, G. (2002). The potential role of donkeys in land tillage in central Ethiopia. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 50, 172-178.
- AEPGA - Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino (2015a). O Burro de Miranda na gestão de vegetação arbustiva-baixa e de ecossistemas de elevado valor conservacionista. Relatório Final. EDP Biodiversidade 2010. Miranda do Douro: AEPGA. 48 pp.
- AEPGA - Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino (2015b). Quem somos - Associação para o Estudo e Protecção do gado asinino. (Acedido em 25/06/2015). URL:<http://www.aepga.pt>.
- AEPGA - Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino (2015c). Raça Asinina de Miranda. (Acedido em 25/06/2015). URL:<http://www.aepga.pt>.
- Afonso-Roque, M.M. (1989). Fauna Helminológica de Vertebrados Terrestres da Ilha de S. Miguel (Açores). Dissertação de Doutoramento. Universidade dos Açores. 509 pp.
- Almeida, G.L., Santurio, J.M., Filho, J.O., Zanette, R.A., Camillo, G., Flores, A.G., Silva, J.H., Rue, M.L. (2012). Predatory activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* in equine strongyle infective larvae on natural pasture in the Southern Region of Brazil. *Parasitology Research*, 110 (2), 657-662.
- Altizer, S., Ostfeld, R.S., Johnson, P.T.J., Kutz, S., Harvell, C.D. (2013). Climate change and infectious diseases: from evidence to a predictive framework. *Science*, 341, 514-519.
- Andersen, U.V., Howe, D.K., Dangoudoubiyam, S., Toft, N., Reinemeyer, C.R., Lyons, E.T., Olsen, S.N., Monrad, J., Nejsun, P., Nielsen, M.K. (2013). SvSXP: a *Strongylus vulgaris* antigen with potential for prepatent diagnosis. *Parasites & Vectors*, 6:84. doi:10.1186/1756-3305-6-84
- Andersen, U.V., Howe, D.K., Olsen, S.N., Monrad, J., Nejsun, P., Lyons, E.T., Nielsen, M.K. (2012). Serological diagnosis of *Strongylus vulgaris* infection. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S29-S30.
- Andersen, U.V., Howe, D.K., Olsen, S.N., Nielsen, M.K. (2013). Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection. *Veterinary Parasitology*, 192 (1-3), 1-9.
- Andersen, U.V., Reinemeyer, C.R., Toft, N., Olsen, S.N., Jacobsen, S., Nielsen, M.K. (2014). Physiologic and systemic acute phase inflammatory responses in young horses repeatedly infected with cyathostomins and *Strongylus vulgaris*. *Veterinary Parasitology*, 201 (1-2), 67-74.

- Angara, T.E.E., Ismail, A.A., Ibrahim, A.M. (2011). The role of donkeys in income generation and the impact of endoparasites on their performance. *Journal for Veterinary Medicine and Animal Production*, 2 (2), 65-89.
- Anjos, D.H.S., Rodrigues, M.L.A. (2003). Structure of the community of the *Strongylidae* nematodes in the dorsal colon of *Equus caballus* from Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 112 (1-2), 109-116.
- Aranguren-Mendez, J., Gomez, M., Jordana, J. (2002). Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. *Heredity*, 89, 207-211.
- Aranguren-Méndez, J., Jordana, J., Gomez, M. (2001). Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection Evolution*, 33, 433-442.
- Aranguren-Mendez, J., Beja-Pereira, A., Avellanet, R., Dzama, K., Jordana, J. (2004). Mitochondrial DNA variation and genetic relationships in Spanish donkey breeds (*Equus asinus*). *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 121, 319-330.
- Araujo, J.M., Araújo, J.V., Braga, F.R., Tavela, A.O., Ferreira, S.R., Soares, F.E.F., Carvalho, G.R. (2012). Control of *Strongyloides westeri* by nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21 (2), 157-160.
- Ardelli, B.F. (2013). Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes. *Parasitology International*, 62 (6), 639-646.
- Arias, M., Cazapal-Monteiro, C., Suárez, J., Miguélez, S., López Arellano, M.E., Suárez, J.L., Mendoza de Gives, P., Sánchez Andrade, R., Paz-Silva, A. (2012). A combined trial of chemotherapy and biological control measures against parasites in grazing horses. Pp 413-418. In: Saastamoinen, M., Fradinho, M.J., Santos, A.S., Miraglia, N.A (Eds.), *Forages and grazing in horse nutrition*, EAAP publication No.132, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. 512 pp.
- Arias, M., Cazapal-Monteiro, C., Valderrábano, E., Miguélez, S., Rois, J.L., López-Arellano, M.E., Carvalho, L.M., Gives, P.M., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. (2013a). A preliminary study of the biological control of strongyles affecting equids in a zoological park. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 1115-1120.
- Arias, M.S., Cazapal-Monteiro, C.F., Suárez, J., Miguélez, S., Francisco, I., Arroyo, F.L., Suárez, J.L., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Gives, P.M. (2013b). Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis. *BioMed Research International*. URL://dx.doi.org/10.1155/2013/567876. Acedido em 23/09/2014.
- Arneberg, P., Skorpington, A., Grenfell, B., Read, A.F. (1998). Host densities as determinants of abundance in parasite communities. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 265, 1283-1289.

- Arsenos, G., Gelasakis, A.I., Papadopoulos, E. (2010). The status of donkeys (*Equus asinus*) in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61 (3), 212-219.
- Asefa, Z., Kumsa, B., Endebu, B., Gizachew, A., Merga, T., Debrla, E. (2011). Endoparasites of donkeys in Sululta and Gefersa Districts of Central Oromia, Ethiopia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 1850-1854.
- Assis, R.C.L., Luns, F.D., Araújo, J.V., Braga, F.R. (2012). Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Experimental Parasitology*, 132 (3), 373-377.
- Atawalna, J., Emikpe, B.O., Sallah, E.K., Shaibu, W., Folitse, R.D. (2015). The health problems, gastrointestinal and blood parasites commonly associated with donkeys in the upper east region of Ghana. *African Journal of Biomedical Research*, 18, 37-41.
- Austin, S.M. (1994). Large strongyles in horses. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 16 (5), 650-657.
- Ayele, G., Feseha, G., Bojia, E., Joe, A. (2006). Prevalence of gastro-intestinal parasites of donkeys in Dugda Bora District, Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*, 18, article #136. URL: [//www.lrrd.org/lrrd18/10/ayel18136.htm](http://www.lrrd.org/lrrd18/10/ayel18136.htm). Acedido em 29/03/2014.
- Bacelar, A.C. (2006). *A utilização do Burro (Equus asinus) como recurso ecoturístico*. Relatório de Estágio realizado no âmbito do II Curso de Pós-Graduação de Turismo de Natureza. Porto: Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. 203 pp.
- Barbosa, J.C. (2003). O gado asinino em Trás-os-Montes. Contribuição para o conhecimento da sua importância socio-económica. In: Acta do V Colóquio Hispano-Português de Estudos Rurais, Bragança, Portugal. 12 pp.
- Barry, T.N., McNeill, D.M., McNabb, W.C. (2001). Plant secondary compounds: their impact on nutritive value and upon animal production. 445-452. In: Proceedings of the XIX International Grassland Conference, São Paulo, Brazil, 445-452.
- Baudena, M.A. (2003). Equine immunity to cyathostome infections. Dissertation of the Graduate, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 134 pp.
- Baudena, M.A., Chapman, M.R., French, D.D., Klei, T.R. (2000). Seasonal development and survival of equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Veterinary Parasitology*, 88, 51-60.
- Becher, A.M., Mahling, M., Nielsen, M.K., Pfister, K. (2010). Selective anthelmintic therapy of horses in the Federal states of Bavaria (Germany) and Salzburg (Austria): An investigation into strongyle egg shedding consistency. *Veterinary Parasitology*, 171 (1-2), 116-122.
- Becher, A.M., Pfister, K. (2010). The efficacy of anthelmintic drugs against horse strongyles in the area of Salzburg and preliminary results of selective anthelmintic treatment. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 122 (3), 71-75.

- Beja-Pereira, A., England, P.R., Ferrand, N., Jordan, S., Bakhiet, A.O., Abdalla, M.A., Mashkour, M., Jordana, J., Taberlet, P., Luikart, G. (2004). African origins of the domestic donkey. *Science*, 304 (5678), 1781.
- Bell, N.J., Morriss, C.J., Trawford, A.F., Reid, S.W.J. (2001). The effect of age and sex on the faecal egg count (FEC) in the donkey. *In: Proceedings 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP)*, Stresa, Italy.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, 18, 365-377.
- Bennett, M.F. (1999). Is there a morning-evening difference in egg production of bloodworms, strongyle parasites of equines? Chronobiology: Its Role in Clinical Medicine, General Biology and Agriculture. *Progress in Clinical and Biological Research*, 341B, 729-733.
- Beugnet, F. (1998). Méthodes de lutte contre les strongyloses equines. *Pratique Vétérinaire Equine*, 30 (120), 45-55.
- Beveridge, I., Gasser, R., Sangster, N. (2014). Hosts and their parasites - Horses. pp. 792-841. *In: Beveridge, I., Emery, D. (Editors), Australian animal parasites inside & out*. The Australian Society for Parasitology Inc, Australia. 1099 pp.
- Bevilaqua, C.M.L., Rodrigues, M.L., Concordet, D. (1993). Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. *Révue de Médecine Vétérinaire*, 144 (12), 989-995.
- Bezerra, S.Q., Couto, M.C.M., Souza, T.M., Bevilaqua, C.M.L., Anjos, D.H.S., Sampaio, I.B.M., Rodrigues, E.M.L.A. (2007). Ciatostomíneos (*Strongylidae-Cyathostominae*) parasitas de cavalos: Ecologia experimental dos estágios pré-parasíticos em graminha tifton 85 (*Cynodon* spp. cv. Tifton 85) na baixada Fluminense. *Parasitologia Latinoamericana*, 62, 27-34.
- Blakeway, S. (2014). The multi-dimensional donkey in landscapes of donkey-human interaction. *Relations Beyond Anthropocentrism*, 2 (1), 59-77.
- Bliss, D.H., Svendsen, E.D., Georgoulakis, I.E., Grosomanidis, S., Taylor, F., Jordan, W.J. (1985). "Strategic use of anthelmintics in working donkeys in Mediterranean climatic conditions". *Veterinary Record*, 117, 613-614.
- Blood, D.C., Radostits, O.M., Arundel, J.H., Gay, C.C. (1989). Diseases caused by helminth parasites. Pp 1016-1063. *In: Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 7th Edition, Baillière Tindall, Book Society Edition, London, England. 1465 pp.
- Bobabee, E.Y.H. (1999). *Role of draft animal power in Ghanaian agriculture*. Pp 61-66. *In: Kaumbutho, P.G., Simalenga T.E. (Editors). Conservation tillage with animal traction*. A resource book of the Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA). Harare. Zimbabwe. 173 pp.

- Boersema, J.H., Eysker, M., Nas, J.W. (2002). Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Veterinary Record*, 150, 279-281.
- Bogale, B., Sisay, Z., Chanie, M. (2012). Strongyle nematode infections of donkeys and mules in and around Bahirdar, Northwest Ethiopia. *Global Veterinaria*, 9(4), 497-501.
- Borji, H., Moosavi, Z., Ahmadi, F. (2014). Cranial Mesenteric Arterial Obstruction Due to *Strongylus vulgaris* Larvae in a Donkey (*Equus asinus*). *Iranian Journal of Parasitology*, 9 (3), 441-444.
- Boulkaboul, A., Bouakkaz, A., Kerboeuf, D. (2006). Détection d'une résistance aux benzimidazoles chez les strongles digestifs du cheval en Algérie. *Révue de Médecine Vétérinaire*, 157 (2), 59-64.
- Bowman, D.D., Coles, T.B., Lynn, R.C., Eberhard, M.L., Lightowers, M.W., Little, S.E. (2014). *Georgi's Parasitology for Veterinarians*. 10th Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. 499 pp.
- Brady, H.A., Nichols, W.T. (2009). Drug resistance in equine parasites: an emerging global problem. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29 (5), 285-295.
- Braga, F.R., Araújo, J.V., Araujo, J.M., Tavela, A.O., Ferreira, S.R., Soares, F.E.F. (2011). Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). *Experimental Parasitology*, 128 (4), 460-463.
- Brazik, E.L., Luquire, J.T., Little, D. (2006). Pyrantel pamoate resistance in horses receiving daily administration of pyrantel tartrate. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228 (1), 101-103.
- Bu, Y., Niu, H., Zhang, L. (2013). Phylogenetic analysis of the genus *Cylicocyclus* (Nematoda: Strongylidae) based on nuclear ribosomal sequence data. *Acta Parasitologica*, 58 (2), 167-173.
- Bucknell, D.G., Hoste, H., Gasser, R.B., Beveridge, I. (1996). The structure of the community of strongyloid nematodes of domestic equids. *Journal of Helminthology*, 70 (3), 185-192.
- Burn, C.C., Dennison, T.L., Whay, H.R. (2010). Environmental and demographic risk factors for poor welfare in working horses, donkeys and mules in developing countries. *The Veterinary Journal*, 186 (3), 385-92.
- Bussiéras, J., Chermette, R. (1991). *Abreg   de Parasitologie Vétérinaire, Fascicule I, Parasitologie général*. Service de Parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Paris, France. 75 pp.
- Buzatti, A., Santos, C.P., Yoshitani, U.Y., Sprenger, L.K., Kloster, F., Antunes, J.D., Molento, M.B. (2012). Biological control using the fungi *Duddingtonia flagrans* against cyathostomins of horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S31.

- Canever, R., Ioshitani, U., Molento, M.B. (2012). Polymorphism at the 167 and 200 Allele of the β -Tubulin Gene in Adults and Larvae of *Cyathostomin* sp. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S46.
- Canever, R.J., Braga, P.R.C., Boeckh, A., Grycajuck, M., Bier, D., Molento, M.B. (2013). Lack of *Cyathostomin* sp. reduction after antihelmintic treatment in horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 194, 35-39.
- Catalano, S.R., Whittington, I.D., Donnellan, S.C., Gillanders, B.M. (2014). Parasites as biological tags to assess host population structure: Guidelines, recent genetic advances and comments on a holistic approach. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3 (2), 220-226.
- Cernea, M., Madeira de Carvalho, L.M., Cozma, V., Cristina, L.C., Raileanu, S., Silberg, R., Gut, A. (2008). Atlas of diagnosis of equine strongylidosis. Cluj-Napoca: Editura AcademicPresEditura, Romania. 118 pp.
- Chapman, M.R., French, D.D., Klei, T.R. (2001). Seasonal Transmission of gastrointestinal parasites of Equids in Southern Louisiana. *Journal of Parasitology*, 87 (6), 1371-1378.
- Chapman, M.R., Kearney, M.T., Klei, T.R. (2003). Equine cyathostome populations: accuracy of species composition estimations. *Veterinary Parasitology*, 116 (1), 15-21.
- Chitra, R., Rajedran, S., Prasanna, D., Kirubakaran, A. (2011). Influences of age on the prevalence of parasitic infections among donkeys in Erode district, Tamilnadu, India. *Veterinary World*, 4 (6), 258-259.
- Clements, R.J.M., McNeilly, T.M., Pickles, K.J., Keen, J.A., Matthews, J.B. (2012). Evaluation of rectal mast cell responses as a novel method to estimate equine cyathostomin burdens. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S32.
- Cobb, R. (2007). Anthelmintic Resistance in Horses. Proceedings of the Roundtable of Nematode Resistance, 11-13 May. Fort Dodge Animal Health, Athens, Greece. 7 pp.
- Coles, G.C., Fews, D., Jones, H.V.F., Hayes, B., Shaddick, K. (2012). The prevalence of helminths with tissue associated stages in horses in the south-west of England. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S47.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136 (3-4), 167-185.
- Collobert, C., Tariel, G., Bernard, N., Lamidey, C. (1996). Prévalence d'infestation et pathogénicité des larves de cyathostominés en Normandie. Étude retrospective à partir de 824 autopsies. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 172 (3-4), 193-200.
- Collobert-Laugier, A., Hoste, H., Sevin, C., Dorchies, P. (2002). Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. *Veterinary Parasitology*, 110 (1-2), 77-83.

- Comer, K.C., Hillyer, M.H., Coles, G.C. (2006). Anthelmintic use and resistance on thoroughbred training yards in the UK. *Veterinary Record*, 158, 596-598.
- CONFAGRI - Confederação Nacional de Cooperativas Agrícolas (2009). Alterações Climáticas - Estatística Nacional. Acedido em 08/12/2015. URL: www.confagri.pt/Ambiente/AreasTematicas/AltClimaticas/Estatisticas/Nacional/est1alteracoesclimaticas.htm.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I. (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology*, 17, 325-330.
- Corbett, C.J., Love, S., Moore, A., Burden, F.A., Matthews, J.B., Denwood, M.J. (2014). The effectiveness of faecal removal methods of pasture management to control the cyathostomin burden of donkeys. *Parasites and Vectors*, 7:48. doi:10.1186/1756-3305-7-48.
- Correia, F.M.P., Martins, M.A.P. (2012). O clima de Trás-os-Montes: características, curiosidades e evolução. Escola Superior de Educação. Instituto Politécnico de Bragança. *AdolesCiência Revista Júnior de Investigação*, 1 (1), 24-33.
- Costa, J.C., Aguiar, C., Capelo, J.H., Lousã, M., Neto, C. (1998). Biogeografia de Portugal continental. *Quercetea*, 1, 5-56.
- Couto, M.Y.R. (2014). Estudo do comportamento alimentar e análise do parasitismo gastrointestinal do Burro de Miranda (*Equus asinus*) em sistema de pastoreio livre. Tese de Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. 98 pp.
- Crane, M.A., Khallaayoune, K., Scantlebury, C., Christley, R.M. (2011). A randomized triple blind trial to assess the effect of an anthelmintic programme for working equids in Morocco. *Veterinary Research*, 7:1. doi:10.1186/1746-6148-7-1.
- Curran, M., Feseha, G., Smith, D. (2005). The impact of access to animal health services on donkey health and livelihoods in Ethiopia. *Journal of Tropical Animal Health and Production*, 37, 47-65.
- Davézé, J., Raveneau, A. (1994). *Le livre de l'âne. Son histoire, sa famille, son éducation, toute sa vie*. Paris: Rustica Editions. 127 pp.
- Davidson, A.J., Hodgkinson, J.E., Proudman, C.J., Matthews, J.B. (2005). Cytokine responses to *Cyathostominae* larvae in the equine large intestinal wall. *Research in Veterinary Science*, 78 (2), 169-176.
- Denel, S. (2001). *Evolution de la population asine du 19ème siècle à nos jours: de la bête de somme au porteur d'un patrimoine*. These pour le Doctorat Vétérinaire N° 287, Diplôme d'Etat, Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Faculté de Medecine de Creteil. 91 pp.

- Dias, A.S., Araújo, J.V., Braga, F.R. (2012). Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. *Parasitology Research*, 110 (2), 663-667.
- Dobson, R.J., Hosking, B.C., Jacobson, C.L., Cotter, J.L., Besier, R.B., Stein, P.A., Reid, S.A. (2012). Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. *Veterinary Parasitology*, 186 (1-2), 79-92.
- Döpfer, A., Kerssens, C.M., Meijer, Y.G.M., Boersema, J.H., Eysker, M. (2004). Shedding consistency of strongyle-type eggs in dutch boarding horses. *Veterinary Parasitology*, 124 (3-4), 249-258.
- Dowdall, S.M.J., Matthews, J.B., Murphy, D., Love, S., Proudman, C.J. (2002). Antigen specific IgG(T) responses in natural and experimental cyathostomin infection. *Veterinary Parasitology*, 106, 225-242.
- Dowdall, S.M.J., Proudman, C.J., Klei, T.R., Mair, T.S., Matthews, J.B. (2004). Antigen specific IgGT responses as a marker for larval cyathostomin infection. *International Journal for Parasitology*, 34, 101-108.
- Drudge, J.H., Lyons E.T. (1992). Internal parasites and their control. 182-199 pp. In: The health of Horses. Powell, D.G., Jackson, S.G. (Eds.). England, London: Longman Scientific Technical. 287 pp.
- Drudge, J.H., Lyons, E.T. (1966). Control of internal parasites of horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 148, 378-383.
- Ducos de Lahitte, J., Havrileck, B. (1990). Strongyloses équine à *Strongylus equinus* et *Strongylus edentatus*. *Le Point Vétérinaire*, 21 (126), 27-35.
- Duffield, H.F., Bell, N., Henson, F.M.D. (2002). Factors associated with impactive colic in the donkey: 14-16 July; Manchester, UK. BEVA Editor, *Equine Veterinary Journal*, 122 pp.
- Duncan, J.L., Abbott, E.M., Arundel, J.H., Eysker, M., Klei, T.R., Krecek, R.C., Lyons, E.T., Reinemeyer, C., Slocombe, J.O.D. (2002). World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP): second edition of guidelines for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 103, 1-18.
- Duncan, J.L., Love, S. (1991). Preliminary observations on an alternative strategy for the control of horse strongyles. *Equine Veterinary Journal*, 23, 226-228.
- Durmic, Z., Blanche, D. (2012). Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 150-162.
- Earle, C.G., Kington, H.A., Coles, G.C. (2002). Helminth control used by trainers of thoroughbreds in England. *Veterinary Record*, 150, 405-408.

- Edward, C., Hoffmann, A. (2007). *Integrated pest management for the horse farm*. Publication No. 07/090. RIRDC Project No UM-71A. Rural Industries Research and Development Corporation Ed., Barton, Australia. 33 pp.
- Eisenmann, V. (1995). L'origine des ânes: questions et réponses paléontologiques. *Ethnozootechnie*, 56, 5-26.
- Elsener, J., Villeneuve, A. (2009). Comparative long-term efficacy of ivermectin and moxidectin over winter in Canadian horses treated at removal from pastures for winter housing. *Canadian Veterinary Journal*, 50, 486-490.
- Engering, A., Hogerwerf, L., Slingenbergh, J. (2013). Pathogen-host-environment interplay and disease emergence. *Emerging Microbes and Infections*. 2:e5. doi:10.1038/emi.2013.5
- EUNIS - European Nature Information System (2015). European Environment Agency: The European Nature Information System (EUNIS). Acedido em 30/09/2015. URL://www.gbif.org/dataset/1bd42c2b-b58a-4a01-816b-bec8c8977927.
- Eysker, M., Bakker, J., Berg, M., Doorn, D.C.K., Ploeger, H.W. (2007). Age clustered pooled faecal samples as monitoring tool in cyathostomiasis in horses. Proceedings of the "21st International Conference of the WAAVP. From EPG to Genes", 19th to 23rd August, Gent, Belgium. Abstract number 150, 204.
- Eysker, M., Boersema, J.H., Kooyman, F.N. (1990). Seasonally inhibited development of cyathostomine nematodes in Shetland ponies in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 36 (3-4), 259-264.
- Eysker, M., Doorn, D.C.K., Van Lems, S.N., Weteling, A., Ploeger, H.W. (2006). Frequent de-worming in horses; the advantage often more damage than good. *Tijdschr Diergeneesk*, 131, 524-530.
- Famoso, N.A., Davis, E.B. (2014). Occlusal enamel complexity in middle miocene to holocene equids (Equidae: Perissodactyla) of North America. *PLOS ONE*, 9 (2): e90184. doi:10.1371/journal.pone.0090184
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (1995). *FAO Production Yearbook*. Volume 48. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization. 51 pp.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014) - The role, impact and welfare of working (traction and transport) animals. Animal Production and Health Report. No. 5. Report of the FAO Headquarters. 13th-17th June 2011. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization. 36 pp.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2004) - *relatório nacional sobre o estado dos recursos genéticos animais de Portugal*. Acedido em 12/07/2015. URL://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1250e/annexes/CountryReports/Portugal.pdf.

- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010) - Draught animal power ... An Overview. Agricultural Engineering Branch. Agricultural Support Systems Division. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Acedido em 12/07/2015. URL://www.fao.org/ag/ags/agse/chapterps1/chapterps1-e.htm.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010) - Recenseamento Agrícola 2009. Efectivos animais. 62-108. Acedido em 12/07/2015. URL://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/World_Census_Agriculture/Country_info_2010/Reports/Reports_2/PRT_POR_REP.VOL2_2009.pdf.
- FAO, IFAD and WFP - Food and Agriculture Organization of the United Nations / International Fund for Agricultural Development / World Food Programme (2015) - *The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress*. Rome, Italy, 56 pp. Acedido em 12/07/2015. URL: <http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>.
- FAO/WFP - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Food Programme (2015) - FAO/WFP Crop and Food Security Assessment Mission to South Sudan. Special Report. 6 May 2015. Sudan. 67 pp. Acedido em 11/07/2015. URL: <http://www.fao.org/3/a-i4569e.pdf>.
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (2015) - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Acedido em 11/07/2015. URL://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/E.
- Fazendeiro, M.I. (1989). *Manual Prático de Técnicas Laboratoriais de Parasitologia*. Unidade de Parasitologia. Estação Zootécnica Nacional e Centro de Emprego de Santarém. Edição Policopiada. 166 pp.
- Fernandes, F.M., Araújo, J.V., Braga F. R (2012). In vitro biological control of infective larvae of *Ancylostoma ceylanicum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21 (3), 283-286.
- Fernández, A.S., Fiel, C.A., Steffan, P.E. (1999). Study on the inductive factors of hypobiosis of *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Veterinary Parasitology*, 81, 295-307.
- Fernández, A.S., Henningsen, E., Larsen, M., Nansen, P., Grønvold, J., Søndergaard, J. (1999). A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* a biological control agent against free-living larvae of horse strongyles. *Equine Veterinary Journal*, 31, 488-491.
- Ferreira, G.M.S., Dutra, F.A.F., Filho, E.F.A., Santos, A.C.G. (2014). Parasitismo gastrointestinal e hematologia em equinos e asininos da mesorregião da aglomeração urbana, São Luís, Maranhão. *Archives of Veterinary Science*, 19 (2), 22-30.
- Feseha, G., Mohammed, A., Yilma, J.M. (1991). Vermicular endoparasitism in donkeys of Debre Zeit and Menagesh, Ethiopia: strategic treatment with ivermectin and fenbendazole. Pp. 156-166. In: Fielding, D., Pearson R.A. (Eds.). *Donkeys, mules and horses in tropical agricultural development*. Centre for Tropical Veterinary Medicine. Scotland, United Kingdom: University of Edinburgh. 336 pp.

- Fikru, R., Reta, D., Bizunesh, M. (2005). Prevalence of equine gastrointestinal parasites in western high lands of Oromia, Ethiopia. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 53 (3), 161-166.
- Filho, E.F.A., Santos, A.C.G., Dutra, F.A.F., Ferreira, G.M.S., Guerra, R.M.C. (2013). Avaliação do parasitismo gastrintestinal de asininos da ilha de São Luís, Estado do Maranhão. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, 9 (17), 393-399.
- Fitsum, M., Ahmed, K.M. (2015). Population dynamic production statistics of horse and ass in Ethiopia: a review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5 (1), 57-62.
- Flanagan, K.L., Morton, J.M., Sandeman, R.M. (2013). Prevalence of infestation with gastrointestinal nematodes in Pony Club horses in Victoria. *Australian Veterinary Journal*, 91 (6), 241-245.
- Fog, P., Vigre, H., Nielsen, M.K. (2011). Strongyle egg counts in Standardbred trotters: are they associated with race performance? *Equine Veterinary Journal*, 39, 89-92.
- Foreyt, W.J. (2001). *Veterinary Parasitology, Reference Manual*. 5th Edition. USA: Blackwell Publishing. 235 pp.
- Francisco, I., Arias, M., Cortiñas, F., Francisco, R., Mochales, E., Sánchez, J.A., Uriarte, J., Suárez, J.L., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Díez-Baños, P., Paz-Silva, A. (2009). Silvopastoralism and autochthonous equine livestock: analysis of the infection by endoparasites. *Veterinary Parasitology*, 164 (2-4), 357-362.
- Francisco, I., Arias, M., Cortiñas, F.J., Francisco, R., Mochales, E., Dacal, V., Suárez, J.L., Uriarte, J., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Díez-Baños, P., Paz-Silva, A. (2009). Intrinsic factors influencing the infection by helminth parasites in horses under an oceanic climate area (NW Spain). *Journal of Parasitology Research*, Article #616173. doi:10.1155/2009/616173.
- Francisco, I., Sánchez, J.A., Cortiñas, F.J., Francisco, R., Mochales, E., Arias, M., Mula, P., Suárez, J.L., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. (2009). Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses. *Equine Veterinary Journal*, 41 (7), 713-715. *Erratum in* 41(8), 830.
- Francisco, R., Paz-Silva, A., Francisco, I., Cortiñas, F.J., Miguélez, S., Suárez, J.L., Cazapal-Monteiro, C.F., Arias, M.S., Sánchez-Andrade, R. (2012). Preliminary analysis of the results of selective therapy against strongyles in pasturing horses. *Journal Equine Veterinary Science*, 32, 274-280.
- Francisco, I., Sánchez, J.A., Cortiñas, F.J., Francisco, R., Suárez, J., Cazapal, C., Suárez, J.L., Arias, M.S., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. (2011). Efficacy of ivermectin pour-on against nematodes infecting foals on pasture: coprological and biochemical analysis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31, 530-535.
- French, J. (1997) – Social behaviour. Pp 113-125. In: SVENDSEN E.D. (Ed.) *The Professional handbook of the Donkey: Compiled for the Donkey Sanctuary*. 3rd edition. London, United Kingdom: Whittet Books. 400 pp.

- Frouco, G., Farrim, A.C., Madeira de Carvalho, L.M. (2012). Estrongilidose em explorações equinas com vocação tauromáquica. XVI Congresso Português de Parasitologia da SPP. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 19 (1/2), 236-237.
- García, J.E.Y. (1999). *El asno Zamorano-Leonés, una grand raza autóctona*. Diputación de Zamora, España. 174 pp.
- Gasser, R.B. (2001). Molecular taxonomic, diagnostic and genetic studies of parasitic helminthes. *International Journal for Parasitology*, 31 (9), 860-864.
- Gauly, M., Bollwein, H., Breves, G., Bruegemann, K., Daenicke, S., Das, G., Demeler, J., Hansen, H., Isselstein, J., Koenig, S. (2013). Future consequences and challenges for dairy cow production systems arising from climate change in Central Europe - a review. *Animal*, 7, 843-859.
- Gebre, W.A., Tegegn, A., Yami, A. (2004). Research needs of donkey utilization in Ethiopia, Pp 77-81. In: Fielding, A., Starkey, P. (Editors). *Donkeys, people and development*. A resource book of the animal traction network for eastern and Southern Africa (ATNESA). Technical center for agriculture and rural cooperation (CTA), The Netherlands: Wageningen Publisher. 248 pp.
- Gebread, F. (1997). Diseases and health problems of donkeys abroad. 207-226 pp. In: SVENDSEN E.D. (Ed.) *The Professional handbook of the Donkey: Compiled for the Donkey Sanctuary*. 3rd edition. London, United Kingdom: Whittet Books. 400 pp.
- Geiger, M. (2013). Exploring donkey welfare and positionality in Maun, Botswana. In partial fulfilment of requirements for the degree of Master of Arts in Geography. Thesis presented to The University of Guelph. Ontario, Canada: University of Guelph. 166 pp.
- Gersão, S., Fradinho, M.J., Neto, I., Caldeira, R., Cabrita, A., Madeira de Carvalho, L. M. (2009) - Dados preliminares sobre a utilização de uma abordagem integrada no controlo da ciatostomiose em equídeos. XI Congresso Ibérico de Parasitologia. IHMT/UNL, Lisboa. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 16 (1/2), 38-39.
- Getachew, A.M., Innocent, G., Proudman, C.J., Trawford, A., Feseha, G., Reid, S.W., Faith, B., Love, S. (2012). Equine cestodosis: a sero-epidemiological study of *Anoplocephala perfoliata* infection in Ethiopia. *Veterinary Research Communications*, 36, 93-98.
- Getachew, M., Trawford, A., Feseha, G., Reid, S.W. (2010). Gastrointestinal parasites of working donkeys of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 42 (1), 27-33.
- Getachew, M.A. (2006). Endoparasites of working donkeys in Ethiopia: epidemiological study and mathematical modelling. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Glasgow. United Kingdom: University of Glasgow. 302 pp.

- Gettinby, G., McKellar, Q.A., Bairden, K., Theodoridis, Y., Whitelaw, A. (1985). Comparison of two techniques used for the recovery of nematode infective larvae from pasture. *Research in Veterinary Science*, 39, 99-102.
- Geurden, T., Van Doorn, D., Claerebout, E., Kooyman, F., Keersmaecker, S., Vercruysse, J., Besognet, B., Vanimisetti, B., Regalbono, A.F., Beraldo, P., Cesare, A., Traversa, D. (2014). Decreased strongyle egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 204 (3-4), 291-296.
- Giacominelli-Stuffler, R., Regalbono, F.A., Traversa, D., Geurden, T., Marcer, F., Francesco, A., Angelini, C., Cesare, A., Storelli, M.M., Maccarrone, M. (2014). The expression and activity of 5-LOX in the large intestine of horses harbouring encysted cyathostomin larvae. *Veterinary Parasitology*, 203 (1-2), 96-101.
- Giles, C.J., Urquhart, K.A., Longstaffe, J.A. (1985). Larval Cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): a report of 15 clinical cases. *Equine Veterinary Journal*, 17 (3), 196-201.
- Giorgi, M., Vullo, C., Vito, V., Catone, G., Faillace, V., Laus, F. (2015). Pharmacokinetic Evaluations of Sulpiride after Intravenous, Intramuscular, and Oral Single-Dose Administration in Jennies (*Equus asinus*). *Journal of Equine Veterinary Science*, 35, 13-18.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M. (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139 (4), 308-20.
- Gobesso, A.A.O. (2014). The horse as key of local development in Brazil: from past to future. Pp 271. In: Animal Production, Book of abstracts No. 20. Abstracts of the 65th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Copenhagen, Denmark: Wageningen Academic Publishers. 489 pp.
- Godinho-Ferreira, P., Azevedo, A., Rego, F. (2005). Carta da Tipologia Florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana*, 13 (1), 1-34.
- Gokbulut, C., Di Loria, A., Gunay, N., Masucci, R., Veneziano, V. (2011). Plasma disposition, concentration in the hair, and anthelmintic efficacy of eprinomectin after topical administration in donkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 72 (12), 1639-1645.
- Gomes, M.E.P., Sousa, L., Coke, C., Lourenço, J.M. (2005). Enquadramento geo-morfológico e geológico das barragens de Miranda do Douro, Picote e Bemposta. *Livro de Resumos do Encontro Ibérico sobre Património Geológico Transfronteiriço na Região do Douro, Freixo de Espada à Cinta*, pp 53-56.

- Gomes, T., Lucena, G., Gomes, L., Santos, C., Monteiro, A., Madeira de Carvalho, L.M. (2006). Dados preliminares sobre a epidemiologia e controlo do parasitismo gastrointestinal num núcleo de asininos de Raça de Miranda do Douro. Proceedings do X Congresso Português de Parasitologia, Lisboa. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 13 (1-2), 88-89.
- Gomes, T., Lucena, G., Gomes, L., Santos, C., Monteiro, A., Madeira de Carvalho, L.M. (2007). Epidemiology and control of strongyle infection in a native donkey breed in Portugal. Proceedings of the 21st International Conference of the WAAVP, Gent, Belgium. pp. 379.
- Gomez, H.H., Georgi, J.R. (1991). Equine helminth infections: control by selective chemotherapy. *Equine Veterinary Journal*, 23, 198-200.
- Gortari, C., Cazau, C., Hours, R. (2007). Nematophagous fungi of *Toxocara canis* eggs in a public place of La Plata, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 24 (1), 24-28.
- Gould, J.C., Rossano, M.G., Lawrence, L.M., Lyons, E.T. (2012). The effects of windrow composting on the viability of *Parascaris equorum* eggs. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S48.
- Greite, L. (2013). Untersuchungen zur verbreitung von strongylus vulgaris im Rahmen der Selektiven Entwurmung bei Pferden in Süddeutschland. PhD thesis. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Grosenbaugh, D.A., Reinemeyer, C.R., Figueiredo, M.D. (2011). Pharmacology and therapeutics in donkeys. *Equine Veterinary Education*, 23, 523-531.
- Groves, C.P. (1995). On the nomenclature of domestic animals. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 52, 137-141.
- Groves, C.P., Ryder, O.A. (2000). Systematics and phylogeny of the Horse. Pp 1-24. In: *The Genetics of the Horse*. Bowling A.T., A. Ruvinsky (Eds.). Wallingford (Oxon., U.K.) & New York: CABI Publishing, 512 pp.
- GTAA - Grupo de Trabalho Agro-Ambiental (2002). Plano de desenvolvimento rural. Portugal Continental. Plano zonal agro-ambiental do Parque Natural do Douro Internacional. Acção 2.1.1. Planos zonais agro-ambientais. Plano de acção 2000- 2002. 68 pp.
- Güiris, A.D., Rojas, H.N., Berovides, A.V., Sosa, P.J., Pérez, E.M., Cruz, A.E., Chávez, H.C., Moguel, A.J., Jimenez-Coello, M., Ortega-Pacheco, A. (2010). Biodiversity and distribution of helminths and protozoa in naturally infected horses from the biosphere reserve “La Sierra Madre de Chiapas”, México. *Veterinary Parasitology*, 170 (3-4), 268-277.
- Halliday, T. (2010). The use of domesticated donkeys as work animals in Ethiopia and the consequences for humans and donkeys. Review Prepared as Part of a BSc. at Melbourne University, Australia.

- Hassan, A.A., Ka-Oud, H.A. (1983). On the hyper resistance of infective strongyloid larvae in hard dry dung. *Journal Egyptian Veterinary Medical Association*, 43 (1/4), 221-225.
- Hassan, M.R., Steenstra, F.A., Udo, H.M.J. (2013). Benefits of donkeys in rural and urban areas in northwest Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*, 8 (48), 6202-6212.
- Hasslinger, M.A. (1981). Influence of various temperatures on eggs larvae of horse strongyles under laboratory conditions, and the behaviour these exogenous stages on pasture. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 94 (1), 1-5.
- Hayward, A.D., Nussey, D.H., Wilson, A.J., Berenos, C., Pilkington, J.G., Watt, K.A., Pemberton, J.M., Graham, A.L. (2014). Natural selection on individual variation in tolerance of gastrointestinal nematode infection. *PLOS Biology*, 12(7): e1001917. doi:10.1371/journal.pbio.1001917.
- Hébert, L., Cauchard, J., Doligez, P., Quitard, L., Laugier, C., Petry, S. (2010). Viability of *Rhodococcus equi* and *Parascaris equorum* eggs exposed to high temperatures. *Current Microbiology*, 60, 38-41.
- Herd, R.P. (1986). Epidemiology and control of equine strongylosis at Newmarket. *Equine Veterinary Journal*, 18, 447-452.
- Herd, R.P. (1998). Control strategies for ruminant and equine parasites to counter resistance, encystment, and ecotoxicity in the USA. *Veterinary Parasitology*, 48, 327-336.
- Hernández, J.A., Arroyo, F., Bonilla, R., Sanchís, J., Pérez, G., Madeira de Carvalho, L.M.; Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S. (2015). Effect of the saprophytic *Mucor circinelloides* on the survival of eggs of *Calicophoron Daubneyi*. L040. *Proceedings of the 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Liverpool, United Kingdom. 788 pp.
- Hertzberg, H., Larsen, M., Maurer, V. (2002). Biological control of helminths in grazing animals using nematophagous fungi. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 115 (7-8), 278-285.
- Hertzberg, H., Schwarzwald, C.C., Grimm, F., Frey, C.F., Gottstein, B., Gerber, V. (2014). Helminth control in the adult horse: the need for a re-orientation. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 156 (2), 61-70.
- Hinney, B., Wirtherle, N.C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K.H., CLAUSEN, P.H. (2011). Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, 108 (5), 1083-1091.
- Hinney, B., Wirtherle, N.C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K.H., Clausen, P.H. (2011). A questionnaire survey on helminth control on horse farms in Brandenburg, Germany and the assessment of risks caused by different kinds of management. *Parasitology Research*, 109, 1625-1635.

- Hodgkinson, J.E. (2006). Molecular diagnosis and equine parasitology. *Veterinary Parasitology*, 136 (2), 109-116.
- Holland, W.G., Geurden, T., DO, T.T., Dorny, P., Vercruysse, J. (2001). Strongyle infections in horses from North Vietnam. *Révue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 54 (1), 29-31.
- Honeder, A., Becher, A.M., Reist, M., Pfister, K. (2012). Factors influencing the magnitude of strongyle eggshedding in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S49.
- Hosseini, S.H., Meshgi, B., Eslami, A., Bokai, S., Sobhani, M., Ebrahimi, R.A. (2009). Prevalence and biodiversity of helminth parasites in donkeys (*Equus asinus*) in Iran. *International Journal of Veterinary Research*, 3 (2), 95-99.
- Houston, R.S., Craig, T.M., Fincher, G.T. (1984). Effects of *Ontophagus gazelle* F (Coleoptera: Scarabaeidae) on free-living strongyloids of equids. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 572-574.
- Hung, G.C., Chilton, N.B., Beveridge, I., Gasser, R.B. (2000). A molecular systematic framework for equine strongyles based on ribosomal DNA sequence data. *International Journal for Parasitology*, 30, 95-103.
- Hutchings, M.R., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Gordon, I.J. (2003). Can animals use foraging behaviour to combat parasites? *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62 (2), 361-370.
- Hutchins, B., Hutchins, P. (1999). *The definitive donkey. A textbook on the modern ass*. Leah Patton Ed. American Donkey Mule Society, Lewisville, USA. 305 pp.
- Hutchinson, G.W., Abba, S.A., Mftilodze, M.W. (1989). Seasonal translation of equine strongyle infective larvae to herbage in tropical Australia. *Veterinary Parasitology*, 33 (3-4), 251-263.
- Ibrahim, N., Berhanu, T., Deressa, B., Tolosa, T. (2011). Survey of prevalence of helminth parasites of donkeys in and around Hawassa Town, Southern Ethiopia. *Global Veterinaria*, 6(3), 223-227.
- Iglesias, A., Avis, K., Benzie, M., Fisher, P., Harley, M., Hodgson, N., Horrocks, L., Moneo, M., Eebb, J. (2007). Adaptation to climate change the agricultural sector. Report to European Commission Directorate - General of Agriculture and Development. AEA Energy & Environment and Universidad de Politécnica de Madrid. 245 pp.
- INE - Instituto Nacional de Estatística (2009). Recenseamento Agrícola 2009. Efectivos animais. 108 pp. Acedido em 12/07/2015. URL: <https://www.ine.pt/>.

- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change (2014). Climate Change 2014. Synthesis Report. Headline statements from the Summary for Policymakers. IPCC Fifth Assessment Report. The IPCC. Integration of three Working Group Reports of the 5th Assessment, 2013-2014. Working Group I: The Physical Science Basis. IPCC, Geneva, Switzerland. Acedido em 12/08/2015. URL://www.ipcc.ch/news_and_events/docs/ar5/ar5_syr_headlines_en.pdf.
- IPMA - Instituto Português do Mar e Atmosfera (sem data). Boletins meteorológicos mensais. Acedido entre janeiro 2010 e outubro 2014. URL:www.ipma.pt.
- Iqbal, Z., Mufti, K.A., Khan, M. (2002). Review: Anthelmintic effects of condensed tannins. *International Journal of Agriculture & Biology*, 4 (3), 438-440.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (2002). Equids: zebras, asses and horses. Status survey and conservation action plan. In: Moehlman, P.D. (Editor). International Union for Conservation of Nature and Natural Resources / Status Survey and Conservation Equid Specialist Group. IUCN/SSC. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom. 190 pp.
- Jankovska, I., Langrová, I., Rada, V. (2000). In vitro cultivation of equine *Cyathostominae* with particular reference to arrested development. *Helminthologia*, 37 (2), 71-76.
- Jatzlau, A., Abdel-Ghaffar, F., Gliem, G., Mehlhorn, H. (2014). Nature helps: food addition of micronized coconut and onion reduced worm load in horses and sheep and increased body weight in sheep. *Parasitology Research*, 113 (1), 305-310.
- Javed, K., Ijaz, M., Ali, M.M., Khan, I., Mehmood, K., Ali, S. (2014). Prevalence and hematology of tick borne hemoparasitic diseases in equines in and around Lahore. *Pakistan Journal of Zoology*, 46 (2), 401-408.
- Jones, P.A. (2008) - Why donkeys should work. Pp 49-53. In: Ochieng, F., Wanja, A. (Eds). *Animal welfare, livelihoods and environment* (Report of 1st Regional Workshop, Nairobi, August 2007). Nairobi: Animal Welfare Action Kenya (AWAKE) and Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA).
- Jordan, W.J. (1986). Surgery. 101-111. In: Svendsen E.D. (Ed.), *The Professional Handbook of the Donkey*. 1st Ed. England: Sovereign Printing Group. 248 pp.
- Kaplan, R.M. (2002). Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research*, 33, 491-507.
- Kaplan, R.M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, 20, 477-481.
- Kaplan, R.M., Klei, T.R., Lyons, E.T., Lester, G., Courtney, C.H., French, D.D., Tolliver, S.C., Vidyashankar, A.N., Zhao, Y. (2004). Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225, 903-910.

- Kaplan, R.M., Nielsen, M.K. (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, 22 (6), 306-316.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N. (2012). An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186 (1-2), 70-78.
- Kassai, T. (1999). *Veterinary Helminthology*. 1st Edition. Oxford, UK: Butterworth Heinemann. 260 pp.
- Kenyon, F., Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., Van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercruysse, J., Jackson, F. (2009). The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 164 (1), 3-11.
- Kenyon, F., Sargison, N.D., Skuce, P.J., Jackson, F. (2009). Sheep helminth parasitic disease in South-Eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Veterinary Parasitology*, 163, 293-297.
- Khallaayoune, K. (1991). Benefit of a strategic deworming programme in working donkeys in Morocco. Pp174-180. *In: Donkeys, Mules and Horses in Tropical Agricultural Development*. Fielding, D., Pearson, R.A. (Eds.). Edinburgh, UK: Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh. 333 pp.
- Kimura, B., Marshall, F.B., Chen, S., Rosenbom, S., Moehlman, P.D., Tuross, N., Sabin, R.C., Peters, J., Barich, B., Yohannes, H., Kebede, F., Teclai, R., Beja-Pereira, A., Mulligan, C.J. (2011). Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. *Proceedings of the Royal Society B*, 278, 50-57.
- Klei, T.R. (2001). Strongyles large and small: immunity. pp.17-18. *In: Immunity & Infection. Proceedings of a Workshop on Equine Immunology*. LUNN, D.P.; WADE, J.F. (Eds.). Santa Fe, New México, Havemeyer Foundation Monograph Series n° 4, 116 pp.
- Kornaś, S., Cabaret, J., Nowosad, B. (2010). *Parascaris* and cyathostome nematodes in foals: parasite in transit or real infection? *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13 (4), 713-717.
- Kornaś, S., Cabaret, J., Skalska, M., Nowosad, B. (2010). Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. *Veterinary Parasitology*, 174 (3-4), 285-291.
- Krecek, R.C. (2013). Parasites of donkeys: a global perspective. *In: Proceedings of the First Donkey Welfare Symposium*, UC Davis, California, USA.
- Krecek, R.C. (2014a). Donkey parasites: detect, diagnose, delete. Lecture Series 2. *In: Proceedings of the Second Donkey Welfare Symposium*, UC Davis, California, USA.

- Krecek, R.C. (2014b). Donkey parasites, hands-on laboratory: be practical, be proactive. Wet Labs/Hands-on workshop Series 2. *In: Proceedings of The Second Donkey Welfare Symposium*, UC Davis, California, USA.
- Krecek, R.C. & Guthrie, A.J. (1999). Alternative approaches to control of cyathostomes: an African perspective. *Veterinary Parasitology*, 85 (2-3), 151-162.
- Krecek, R.C., Guthrie, A.J., Van Nieuwenhuizen, L.C., Booth, L.M. (1994). A comparison between the effects of conventional and selective antiparasitic treatments on nematode parasites of horses from two management schemes. *Journal of the South African Veterinary Association*, 65 (3), 97-100.
- Krecek, R.C. & Waller, P.J. (2006). Towards the implementation of the “basket of options” approach to helminth parasite control of livestock: Emphasis on the tropics/subtropics. *Veterinary Parasitology*, 139 (4), 270-282.
- Kugler, W., Grunenfelder, H., Broxham, E. (2008). Donkey breeds in europe inventory, description, need for action, conservation. Report 2007/2008. Monitoring Institute 2008. Werner Stamm Foundation for the Support of Rare Equines, Oberwil BL, Margarethe & Rudolf Gsell Foundation, Basel, and Bristol Foundation, Zurich, Switzerland. 62 pp.
- Kuhnert-Paul, Y., Schmäschke, R., Dauschies, A. (2012). Effect of distribution of eggs of strongyles and *Parascaris equorum* in faecal samples of horses on detection with a combined sedimentation-flotation method. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G Grosstiere Nutztiere*, 40 (1), 21-26.
- Kutz, S.J., Hoberg, E.P., Molnár, P.K., Dobson, A., Verocai, G.G. (2014). A walk on the tundra: Host-parasite interactions in an extreme environment. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3, 198-208.
- Kuzmina, T., Kharchenko, V., Zvegintsova, N. (2007). Comparative study of the intestinal strongylid communities of equidae in the Askania-Nova biosphere reserve, Ukraine. *Journal of Helminthology*, 44 (2), 62-69.
- Kuzmina, T.A. (2012). Strongylids (Nematoda: Strongylidae) of domestic horses in Ukraine: modern state of Fauna and structure of the parasite community. *Parazitologia*, 46 (2), 127-138.
- Kuzmina, T.A., Kharchenko, V.A., Zvegintsova, N.S. (2006a). Investigation of the gastrointestinal parasite community of donkeys in Ukraine. Proceedings of the 5th International Colloquium on Working Equines - The future for working equines. Addis Ababa, Ethiopia.
- Kuzmina, T.A., Kuzmin, Y.I. (2008). The community of strongylids (Nematoda, Strongylida) of working donkeys (*Equus asinus*) in Ukraine. *Vestnik zoologii*, 42 (2), 18-23.
- Kuzmina, T.A., Kuzmin, Y.I., Kharchenko, V.A. (2006). Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine. *Veterinary Parasitology*, 141, 264-272.

- Kuzmina, T.A., Kuzmin, Y.I., Kharchenko, V.A. (2006b). Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine. *Veterinary Parasitology*, 141, 264-272.
- Kuzmina, T.A., Lyons, E.T., TOLLIVER, S.C. (2012a). Egg-productivity of horse strongylids: why fecal egg counts can be misleading. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S33.
- Kuzmina, T.A., Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Dzeverin, I.I., Kharchenko, V.A. (2012b). Fecundity of various species of strongylids (Nematoda: Strongylidae)- parasites of domestic horses. *Parasitology Research*, 111 (6), 2265-2271.
- Kuzmina, T.A., Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Kharchenko, V.A. (2012c). The influence of anthelmintic treatment on strongylid (Nematoda: Strongylidae) community structure in domestic and wild equids. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S49-S50.
- Kuzmina, T.A., Tolliver, S.C., Lyons, E.T. (2011). Three recently recognized species of cyathostomes (Nematoda: Strongylidae) in equids in Kentucky. *Parasitology Research*, 108 (5), 1179-1184.
- Kyriazakis, I., Houdijk, J. (2006). Immunonutrition: Nutritional control of parasites. *Small Ruminant Research*, 62, 79-82.
- Langrová, I., Jankovská, I., Borovsky, M., Fiala, T. (2003). Effect of climatic influences on the migrations of infective larvae of *Cyathostominae*. *Veterinary Medicine - Czech*, 48 (1-2), 18-24.
- Lanz, S., Gerber, V., Marti, E., Rettmer, H., Klukowska-Rötzler, J., Gottstein, B., Matthews, J.B., Pirie, S., Hamza, E. (2013). Effect of hay dust extract and cyathostomin antigen stimulation on cytokine expression by PBMC in horses with recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 155 (4), 229-237.
- Lawson, E., Burden, F., Elsheikha, H.M. (2014). Pyrantel resistance in two herds of donkey in the UK. *Veterinary Parasitology*, 207 (3-4), 346-349.
- Lester, H., Bartley, D., Morgan, E., Hodgkinson, J., Matthew, J. (2012). The spatial distribution of strongyle eggs in horse faeces. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S33-S34.
- Lester, H., Bartley, D., Morgan, E., Hodgkinson, J., Stratford, C., Matthews, J. (2012). A comparison of three methods for calculating anthelmintic efficacy in equids. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S34-S35.
- Lester, H.E., Matthews, J.B. (2014). Faecal worm egg count analysis for targeting anthelmintic treatment in horses: points to consider. *Equine Veterinary Journal*, 46 (2), 139-145.

- Lester, H.E., Spanton, J., Stratford, C.H., Bartley, D.J., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Coumbe, K., Mair, T., Swan, B., Lemon, G., Cookson, R., Matthews, J.B. (2013). Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in Southern England. *Veterinary Parasitology*, 197 (1-2), 189-196.
- Levecke, B., Dobson, R.J., Speybroeck, N., Vercruysse, J., Charlier, J. (2012). Novel insights in the faecal egg count reduction test for monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 188 (3-4), 391-396.
- Lichtenfels, J.R. (1980). Keys to genera of the superfamily Strongyloidea. In: *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates.*, ANDERSON, R.C., CHABAUD, A.G. & WILLMOTT, S. (Eds.). Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks, England. 41 pp.
- Lichtenfels, J.R., Gibbons, L.M., Krecek, R.C. (2002). Recommended terminology and advances in the systematics of the Cyathostomina (Nematoda: Strongyloidea) of horses. *Veterinary Parasitology*, 107 (4), 337-342.
- Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A., Dvojnos, G.M. (2008). Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Veterinary Parasitology*, 156 (1-2), 4-161.
- Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A., Krecek, R.C., Gibbons, L.M. (1998). An annotated checklist by genus and species of 93 species level names for 51 recognized species of small strongyles (Nematoda: Strongyloidea: Cyathostomina) of horses, asses and zebras of the world. *Veterinary Parasitology*, 79 (1), 65-79.
- Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A., Krecek, R.C., Gibbons, L.M. (1999). An annotated checklist by genus and species of 93 species level names for 51 recognized species of small strongyles (Nematoda: Strongyloidea: Cyathostomina) of horses, asses and zebras of the world. *Veterinary Parasitology*, 84 (1-2), 137-138.
- Lind E.O., Eysker, M., Nilsson, O., Ugglä, A., Höglund, J. (2003). Expulsion of small strongyle nematodes (cyathostomin spp) following deworming of horses on a stud farm in Sweden. *Veterinary Parasitology*, 115(4), 289-299.
- Lindgren, K., Ljungvall, Ö., Nilsson, O., Ljungström, B.L., Lindahl, C., Höglund, J. (2008). *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 151 (2-4), 337-343.
- Lloyd, S., Martin, S.A. (2006). Controlled trial on the effects of radionic healing and anthelmintics on faecal egg counts in horses. *Veterinary Record*, 158, 734-737.
- Lloyd, S., Smith, J., Connan, R.M., Hatcher, M.A., Hedges, T.R., Humphrey, D.J., Jones, A.C. (2000). Parasite control methods used by horses owners: factors predisposing to the development of anthelmintic resistance in nematodes. *Veterinary Record*, 146, 487-492.

- Lopes, A. S., Melo-Franco, B., Nunes, T., Fabrica, P., São Braz, B., Madeira de Carvalho, L.M. (2014). Mapeamento parasitológico dos equídeos em Portugal continental - 3 anos de Rastreio STOP. XVII Congresso Sociedade Portuguesa de Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 20 (1/2) 130-131.
- Lopes, A. S., Melo-Franco, B., Nunes, T., Fabrica, P., São Braz, B., Madeira de Carvalho, L.M. (2015). "Survey stop": a sustainable approach for improvement of horse parasite control in Portugal. Poster Number P1A210. Abstract Book. 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Liverpool. United Kingdom. 788 pp.
- López-Plaza, M. (2005). Descubrir el paisaje en las arribes del Duero: una tarea muy atractiva. *Livro de Resumos do Encontro Ibérico sobre Património Geológico Transfronteiriço na Região do Douro, Freixo de Espada à Cinta, 7 e 8 de Setembro 2005*, 11-13.
- Love, S. (2003). Treatment and prevention of intestinal parasite-associated disease. 791-806. In: Jones, S.L. (Ed.). *Therapeutics for Gastrointestinal Diseases. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 19 (3), 575-826.
- Love, S., Duncan, J. L. (1991). Could the worms have turned? *Equine Veterinary Journal*, 23 (3), 152-154.
- Love, S., Murphy, D., Mellor, D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infection. 113-122. In: Little, S.A., Moore, J.N., Dipietro, J.A. (Eds.) Special issue: Equine Cyathostome Conference. Proceedings of a Conference on Equine Cyathostomes held at the University of Geórgia, Athens, GA, 7-8 November 1998. *Veterinary Parasitology*, 85 (2-3), 95-225.
- Ludwig, K.G. & Johnstone, C. (1984). Use of pasture sampling to determine equine strongyle larvae contamination. *Veterinary Medicine*, 79, 1183-1189.
- Lyndal-Murphy, M., Swain, A.J., Pepper, P.M. (2014). Methods to determine resistance to anthelmintics when continuing larval development occurs. *Veterinary Parasitology*, 199 (3-4), 191-200.
- Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C. (1990). Prevalence of some internal parasites found 1971-1989 in horses born on a farm in central Kentucky. *Journal of Equine Veterinary Science*, 10, 99-107.
- Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C. (2000). Larval Cyathostomiasis. Pp. 501-513. In Timoney, P.J. (Ed.) *Veterinary Clinics North America: Equine Practice, Emerging Infectious Diseases*, 16 (3), 387-628.
- Lyons, E.T., Kuzmina, T.A., Tolliver, S.C., Collins, S.S. (2011). Observations on development of natural infection and species composition of small strongyles in young equids in Kentucky. *Parasitology Research*, 109 (6), 1529-1535.

- Lyons, E.T., Swerczek, T.W., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Stamper, S., Granstrom, D.E., Holland, R.E. (1994). A study of natural infections of encysted small strongyles in a horse herd in Kentucky. *Journal of Veterinary Medicine*, 89 (121), 1146-1155.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C. (2013). Further indication of lowered activity of ivermectin on immature small strongyles in the intestinal lumen of horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitology Research*, 112 (2), 889-891.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Collins, S.S. (2007). Study (1991 to 2001) of drug-resistant Population B small strongyles in critical tests in horses in Kentucky at the termination of a 40-year investigation. *Parasitology Research*, 101 (3), 689-701.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Collins, S.S. (2009). Probable reason why small strongyle EPG counts are returning "early" after ivermectin treatment of horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitology Research*, 104 (3), 569-574.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Collins, S.S. (2011). Reduced activity of moxidectin and ivermectin on small strongyles in young horses on a farm (BC) in Central Kentucky in two field tests with notes on variable counts of eggs per gram of feces (EPGs). *Parasitology Research*, 108 (5), 1315-1319.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H. (1999). Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. *Veterinary Parasitology*, 85, 97-112.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Ionita, M., Lewellen, A., Collins, S.S. (2008). Field studies indicating reduced activity of ivermectin on small strongyles in horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitology Research*, 103, 209-215.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Kuzmina, T.A. (2012). Investigation of strongyle EPG values in horse mares relative to known age, number positive, and level of egg shedding in field studies on 26 farms in Central Kentucky (2010-2011). *Parasitology Research*, 110 (6), 2237-2245.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Kuzmina, T.A., Dzeverin, I.I., Nielsen, M.K., McDowell, K.J. (2014). Profiles of strongyle EPG values for Thoroughbred mares on 14 farms in Kentucky (2012-2013). *Veterinary Parasitology*, 205 (3-4), 646-652.
- MacFadden, B.J. (2013). Dispersal of pleistocene *Equus* (family Equidae) into South America and Calibration of GABI 3 Based on Evidence from Tarija, Bolivia. *PLOS ONE*, 8 (3): e59277. doi:10.1371/journal.pone.0059277
- Madeira de Carvalho, L.M. (2006). Estrongilidose dos equídeos - biologia, patologia, epidemiologia e controlo. Pp. 277-326. In: "In Memoriam Prof. Ignacio Navarrete López-Cózar", Tovar, J. & Reina, D. (Eds.). ISBN 84-690-2894-4, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España. 660 pp.

- Madeira de Carvalho, L.M., Bernardo, F.A., Paz-Silva, A. (2012). The role of fungi in the control of animal parasites - classification, mode of action and practical applications. Pp. 271-308. In: Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease. A. PAZ-SILVA & M.S. ARIAS VÁZQUEZ (Eds.). Nova Science Publishers. Hauppauge, New York, USA. 531 pp.
- Madeira de Carvalho, L.M. (2001). Epidemiologia e controlo da estrongilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal. Tese de Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Edição do autor. 445 pp.
- Madeira de Carvalho, L.M. (2006a). Os equídeos em Portugal: de animais de produção a animais de companhia. I - Impacte nas Doenças Parasitárias. *Medicina Veterinária*, 62, 13-24.
- Madeira de Carvalho, L.M., Fazendeiro, M.I., Afonso-Roque, M.M. (2007). Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos estrongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos. 2. Géneros *Gyalocephalus*, *Poteriostomum*, *Craterostomum*, *Oesophagodontus*, *Triodontophorus*, *Strongylus* e *Trichostrongylus*. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 14 (1/2), 23-34.
- Madeira de Carvalho, L.M., Fazendeiro, M.I., Afonso-Roque, M.M. (2008). Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos estrongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos. 3. Conclusões, perspectivas futuras e proposta de chave de identificação de alguns nemátodes gastrintestinais mais comuns dos equídeos em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 15 (1/2), 57-63.
- Madeira de Carvalho, L.M., Fazendeiro, M.I., Afonso-Roque, M.M. (2008a). Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos estrongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos. 4. Estudo das populações de ciatostomíneos de equídeos bravios e domésticos através do método de análise dos morfotipos de L3 de *Cyathostomum* sensu latum. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 15 (1/2), 65-70.
- Madeira de Carvalho, L.M., Gillespie, A.T., Serra, P.M., Bernardo, F.A., Farrim, A.P., fazendeiro, I. (2007b). Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controlo biológico da estrongilidose equina no Ribatejo. *Revista Portuguesa Ciências Veterinárias*, 102 (563-564), 233-247.
- Madeira de Carvalho, L.M., Gomes, L., Cernea, M., Cernea, C., Santos, C.A., Bernardes, N., Rosário, M.A., Soares, M.J., Fazendeiro, I. (2007a). Parasitismo gastrintestinal e seu controlo em asininos e híbridos estabulados. *Revista Portuguesa Ciências Veterinárias*, 102 (563-564), 225-231.
- Madeira de Carvalho, L.M., Sousa, S., Cernea, M., Cernea, L.C., Arias, M., Paz-Silva, A. (2014). Strongyles shed in faeces as a means of monitoring the parasite scenario in horse stud farms. Pp. 93-125. In: Adolfo Paz Silva, María Sol Arias & Rita Sánchez-Andrade (Eds.) *Horses: Breeding, Health Disorders and Effects on Performance & Behavior*. Nova Science Publishers, New York, USA. 185 pp.

- Madeira de Carvalho, L.M., Afonso-Roque, M.M. (1995). Estrongilidose intestinal dos equídeos residentes em regiões insulares (Açores, Cabo Verde e S. Tomé e Príncipe) - Contribuição para o seu conhecimento. *IV Congreso Ibérico de Parasitología, Santiago de Compostela*, 24-28 de Júlio de 1995, Libro de Resúmenes, pp 110-111.
- Madeira de Carvalho, L.M., Afonso-Roque, M.M., Fazendeiro, M.I. (2003). Morfotipos de L3 do género *Cyathostomum* sensu lato (Nematoda: Strongyloidea) - Aplicações no estudo do parasitismo por ciatostomíneos em equinos. VII Congresso Português de Parasitologia, Sociedade Portuguesa de Parasitologia, IHMT, Lisboa, 9-11 Abril 2003. *Acta Parasitológica Portuguesa*, pp. 2.
- Madeira de Carvalho, L.M., Fazendeiro, M.I., Afonso-Roque, M.M. (2004). Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos estrongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos . 1. Género *Cyathostomum*, sensu lato. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 11 (1/2), 21-32.
- Madeira de Carvalho, L.M., Fazendeiro, M.I., Afonso-Roque, M.M. (2005). Estudo do padrão sazonal dos ovos e larvas de estrongilídeos do cavalo numa exploração do Ribatejo, através da contaminação de parcelas experimentais em pastagens espontâneas de sequeiro. IX Congresso Ibérico de Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 25 a 28 de Outubro de 2005. *Acta Parasitológica Portuguesa*, pp. 285-286.
- Madeira de Carvalho, L.M., Gillespie, A.T., Serra, P.M., Bernardo, F.A., Farrim, A.P., Fazendeiro, M.I. (2007d). Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controlo biológico da estrongilidose equina no Ribatejo. *Revista Portuguesa das Ciências Veterinárias*, 102 (563-564), 233-247.
- Madeira de Carvalho, L.M., Gomes, L., Cernea, M., Cernea, C., Santos, C.A., Bernardes, N., Rosário, M.A., Soares, M.J., Fazendeiro, M.I. (2007c). Parasitismo gastrointestinal e seu controlo em asininos e híbridos estabulados. *Revista Portuguesa das Ciências Veterinárias*, 102 (563-564), 225-231.
- Madeira de Carvalho, L.M., Pereira da Fonseca, I.M., Afonso-Roque, M.M., Marcos, M.V.M., Carvalho-Varela, M. (1993). Estudo das parasitoses dos equídeos do Ribatejo: parasitoses gastrintestinais e pulmonares. *III Congreso Ibérico de Parasitología, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, 4 a 8 de Outubro de 1993. Acta Parasitológica Portuguesa*, 1 (2), 59.
- Madeira de Carvalho, L.M., Serra, P.M., Bernardo, F.A., Agrícola, R., Jorge, H., Farrim, A.P., Fazendeiro, I.M., Paz-Silva, A. (2011). Controlo integrado da estrongilidose equina com anti-helmínticos associados ao fungo *Duddingtonia flagrans* - Aspectos da sua utilização em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 18 (1/2), 63-90.
- Magistrini, M., Milon, P., Caillaud, M., Sabbagh, M., Mea, F., Danvy, S. (2014). France commits in the preservation of its horses and donkeys genetic resources. Pp 376. In: *Animal Production, Book of abstracts* No. 20. 65th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Copenhagen, Denmark. 25-28 August 2014. Wageningen Academic Publishers. 489 pp.

- Marshall, K., Ali, Z. (2004). Donkey utilization. Pp 77-81. In: Fielding, D., Starkey, P. (Eds.). *Donkeys, people and development*. A resource book of the animal traction network for eastern and Southern Africa (ATNESA). Technical center for agriculture and rural cooperation (CTA), Wageningen, The Netherlands, 244 pp.
- Martins, S. & Madeira de Carvalho, L.M. (2007). Eficácia, período de reaparecimento de ovos e resistência a anti-helmínticos utilizados no controlo parasitário de equinos em Portugal. In: Madeira de Carvalho, L.M. & Grácio, A.J.S. (EDS) *Resistência aos Anti-Parasitários e Controlo Integrado das Parasitoses Animais*. Mesa Redonda do IX Congresso Ibérico de Parasitologia, Universidade de Coimbra, 25-28 de Outubro de 2005. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 14 (1/2), 5-7.
- Mateos-Gonzalez, F., Sundström, L.F., Schmid, M., Björklund, M. (2015). Rapid evolution of parasite resistance in a warmer environment: insights from a large scale field experiment. *PLOS ONE*, 10(6):e0128860. doi:10.1371/journal.pone.0128860
- Matthee, S., Krecek, R.C., McGeoch, M.A. (2004). A comparison of the intestinal helminth communities of equidae in Southern Africa. *Journal of Parasitology*, 90 (6), 1263-1273.
- Matthee, S., Krecek, R.C., Milne, S.A. (2000). Prevalence and biodiversity of helminth parasites in donkeys from South Africa. *Journal of Parasitology*, 86 (4), 756-762.
- Matthee, S., Dreyer, F.H., Hoffmann, W.A., Niekirk, F.E. (2002). An introductory survey of helminth control practices in South Africa and anthelmintic resistance on Thoroughbred stud farms in the Western Cape Province. *Journal of the South African Veterinary Association*, 73, 195-200.
- Matthee, S., Krecek, R.C., Gibbons, L.M. (1998). Prevalence and biodiversity of helminth parasites in donkeys in South Africa. *Parasitology International*, 47, 133-281.
- Matthee, S., Krecek, R.C., Gibbons, L.M. (2002a). *Cylicocyclus asini* (Nematoda: Cyathostominae) from donkeys *Equus asinus* in South Africa. *Journal Systematic Parasitology*, 51 (1), 29-35.
- Matthee, S., Krecek, R.C., Milne, S.A., Boshoff, M., Guthrie, A.J. (2002b). Impact of management interventions on helminth levels, and body and blood measurements in working donkeys in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 107 (2), 103-113.
- Matthews, B.E. (1998). An introduction to parasitology. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 192 pp.
- Matthews, J.B. (2004). The control of small strongyles in large donkey populations. Donkey: hero or villain of the parasite world? Past, present and future. Morris, C., Trawford, A., Svendsen, E. (Eds.), *The Donkey Sanctuary, Veterinary Parasitology*, 125, 43-58.
- Matthews, J.B. (2008) - An update on cyathostomins: anthelmintic resistance and worm control. *Equine Veterinary Education*, 20, 552-560.

- Matthews, J.B. (2014). Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4, 310-315.
- Matthews, J.B. & Burden, F.A. (2013). Common helminth infections of donkeys and their control in temperate regions. *Equine Veterinary Education*, 25 (9), 461-467.
- Matthews, J.B., Hodgkinson, J.E., Dowdall, S.M., Proudman, C.J. (2004a). Recent developments in research into the *Cyathostominae* and *Anoplocephala perfoliata*. *Veterinary Research*, 35 (4), 371-381.
- Mattioli, R.C., Zinsstag, J., Pfister, K. (1994). Frequency of trypanosomosis and gastrointestinal parasites in draught donkeys in The Gambia in relation to animal husbandry. *Tropical Animal Health and Production*, 26, 102-108.
- Matto, T.N., Bharkad, G.P., Bhat, S.A. (2015). Prevalence of gastrointestinal helminth parasites of equids from organized farms of Mumbai and Pune. *Journal of Parasitic Diseases*, 39 (2), 179-185.
- McCraw, B.M. & Slocombe, J.O. (1978). *Strongylus edentatus*: development and lesions from ten weeks post-infection to patency. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 42 (3), 340-356.
- McCraw, B.M. & Slocombe, J.O. (1985). *Strongylus equinus*: development and pathological effects in the equine host. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47 (4), 372-383.
- McCraw, B.M. & Slocombe, J.O.D. (1976). *Strongylus vulgaris* in the horse: a review. *Canadian Veterinary Journal*, 17 (6), 150-157.
- McWilliam, H.E.G., Nisbet, A.J., Dowdall, S.M.J., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B. (2010). Identification and characterization of a potential immunodiagnostic marker for larval cyathostomiasis. *International Journal for Parasitology*, 40, 265-275.
- Medeiros, A.C., Gomes, L., Nunes, T.P., Falcão e Cunha, A.L., Tilley, P.A., Madeira de Carvalho, L.M. (2011). Epidemiologia da estrongilidose em equídeos de raça Garrana no Parque Nacional da Peneda Gerês (PNPG) e Instituto Superior de Agronomia de Lisboa (ISA). *Acta Parasitológica Portuguesa*, 18 (1/2), 99-108.
- Medeiros, A.C., Gomes, L., Nunes, T.P., Tilley, P.A., Sales Luís, J.P., Madeira de Carvalho, L.M. (2011). Relação entre a estrongilidose e as doenças alérgicas (Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA), dermatite atópica e hipersensibilidade à picada de insectos) em equídeos em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 18 (1/2), 91-98.
- Medica, D.L., Sukhdeo, M.V.K. (1997). Role of lipids in the transmission of the infective stage (L3) of *Strongylus vulgaris* (Nematoda: Strongyloidea). *Journal of Parasitology*, 83 (5), 775-779.
- Medica, D.L., Sukhdeo, M.V.K. (2001). Estimating transmission potential in gastrointestinal nematodes (Order: Strongylida). *Journal of Parasitology*, 87 (2), 442-445.

- Meier, K., Becher, A.M., Reist, M., Pfister, K. (2012). Influence of the variability of McMaster results on selective anthelmintic treatment in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S35.
- Meirinhos L.M.P. (2014). A evolução da Terra de Miranda: Um estudo com base nos Sistemas de Informação Geográfica. Tese de Dissertação de Mestrado Integrado em Sistemas de Informação Geográfica e Ordenamento do Território, Faculdade de Letras, Universidade do Porto. 141 pp.
- Meirinhos, J.F. (2000). *Estudos mirandeses, balanço e orientações*. Granito Editores e Livreiros. 279 pp.
- Melo-Franco, B., Botelho, M., Francisco, P., Fernandes, R., Gomes, L., ALHO, A.M., Madeira de Carvalho, L.M. (2015). Epidemiology and control of intestinal helminths in two Lusitano horse stud farms in Center and South of Portugal. Poster Number P1B073. In: Abstract Book. 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 16-20 August, 2015. Liverpool. United Kingdom. 788 pp.
- Méndez, G.S. & Aguiar, C. (2010). Ecología de los “lameiros” en una aldea del Planalto de Miranda, Trás-os-Montes, Portugal. In: Pastos: Fuente Natural de Energía. Resumos da 4ª Reunião Iberica de Pastagens e Forragens. Botânica e Ecologia. 3-6 Maio 2010. Zamora - Miranda do Douro. Pp 75-80.
- Menzel, M., Becher, A.M., Reist, M., Pfister, K. (2012). Implementation of selective anthelmintic treatment in an equine-practice in Upper Bavaria (Germany): 1st experiences. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S35-S36.
- Menzel, M.A. (2013). Selektive entwurmung der pferde in einer oberbayrischen pferdepraxis: einführung sowie wissenschaftliche und betriebswirtschaftliche analyse. PhD thesis. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Metz, R. (1995). Conocer los asnos y las mulas. Editorial De Vecchi, Barcelona, España. 110 pp.
- Mezgebu, T., Tafess, K., Tamiru, F. (2013). Prevalence of gastrointestinal parasites of horses and donkeys in and around Gondar Town, Ethiopia. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 3, 267-272.
- Mfitilodze, M.W. & Hutchinson, G.W. (1987). Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 23 (1-2), 121-133.
- Mfitilodze, M.W. & Hutchinson, G.W. (1988). Development of free-living stages of equine strongyles in faeces on pasture in a tropical environment. *Veterinary Parasitology*, 26 (3-4), 285-296.
- Molento, M.B., Antunes, J., Bentes, R.N., Coles, G.C. (2008). Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Veterinary Record*, 162, 384-385.

- Molento, M.B., Nielsen, M.K., Kaplan, R.M. (2012). Resistance to avermectin/milbemycin anthelmintics in equine cyathostomins - current situation. *Veterinary Parasitology*, 185 (1), 16-24.
- Molnár, P.K., Kutz, S.J., Hoar, B.M., Dobson, A.P. (2013). Metabolic approaches to understanding climate change impacts on seasonal host-macroparasite dynamics. *Ecology Letters*, 16, 9-21.
- Molnar, V. & Kassai, T. (1994). The distribution of nematode egg counts and larval counts in grazing sheep and their implications for parasite control. *Veterinary Parasitology*, 24 (I), 103-108.
- Monteiro, A. & Amaro, D. (2000). Parque Natural do Douro Internacional: Uma área protegida nas Arribas do Douro e Águeda. In: González, J., Alberti, J., Fernández, A., Alonso, M. (Eds.). Arribes del Duero: el hogar del águila perdicera y de la cigüeña negra. Desarrollo del proyecto LIFE-NAT-B4/3200/97/253. Junta de Castilla y Leon, Consejería de Meio Ambiente, 190, 159-186.
- Moreira, N., Aguiar, C., Pires, J.M. (2001). Lameiros e outros prados e pastagens de elevado valor florístico. Pastagens de Montanha. Direcção Geral de Desenvolvimento Rural. Lisboa. 47 pp.
- Morgan, E.R., Charlier, J., Hendrickx, G., Biggeri, A., Catalan, D., Von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Müller, E., Van Dijk, J., Kenyon, F., Skuce, P., Höglund, J., O’Kiely, P., Van Ranst, B., Waal, T., Rinaldi, L., Cringoli, G., Hertzberg, H., Torgerson, P., Wolstenholme, A., Vercruysse, J. (2013). Global change and helminth infections in grazing ruminants in Europe: impacts, trends and sustainable solutions. *Agriculture*, 3, 484-502.
- Morgan, E.R. & Wall, R. (2009). Climate change and parasitic disease: Farmer mitigation? *Trends Parasitology*, 7, 308-313.
- Morris, C., Trawford, A., Svendsen, E. (2004). Donkey: hero or villain of the parasite world? Past, present and future. Morris, C., Trawford, A., Svendsen, E. (Eds.). The Donkey Sanctuary. *Veterinary Parasitology*, 125, 43-58.
- Morrow, L.D., Smith, K.C., Piercy, R.J., Toit, N.F., Burden, A., Olmos, G.N., Gregory, G., Verheyen, K.L.P. (2011). Retrospective analysis of post-mortem findings in 1,444 aged donkeys. *Journal of Comparative Pathology*, 144, 145-156.
- Näreaho, A., Vainio, K., Oksanen, A. (2011). Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. *Veterinary Parasitology*, 182 (2-4), 372-377.
- Nielsen, M.K., Kaplan, R.M., Thamsborg, S.M., Monrad, J., Olsen, S.N. (2007). Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles. Implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *The Veterinary Journal*, 174, 23-32.

- Nielsen, M.K. (2009). Restrictions of anthelmintic usage: perspectives and potential consequences. *Parasites & Vectors*, 2 (Suppl 2), S7.
- Nielsen, M.K. (2012). Sustainable equine parasite control: perspectives and research needs. *Veterinary Parasitology*, 185 (1), 32-44.
- Nielsen, M.K., Baptiste, K.E., Tolliver, S.C., Collins, S.S., Lyons, E.T. (2010a). Analysis of multiyear studies in horses in Kentucky to ascertain whether counts of eggs and larvae per gram of feces are reliable indicators of numbers of strongyles and ascarids present. *Veterinary Parasitology*, 174 (1-2), 77-84.
- Nielsen, M.K., Betancourt, A., Lyons, E.T., Horohov, D.W., Jacobsen, S. (2013a). Characterization of the inflammatory response to anthelmintic treatment of ponies with cyathostomiasis. *The Veterinary Journal*, 198 (2), 457-462.
- Nielsen, M.K., Fritzen, B., Duncan, J.L., Guillot, J., Eysker, M., Dorschies, P., Samson-Himmelstjerna, G. V. (2010b). Practical aspects of equine parasite control: a review based upon a workshop discussion consensus. *Equine Veterinary Journal*, 42 (5), 460-468.
- Nielsen, M.K., Haaning, N., Olsen, S.N. (2006a). Strongyle egg shedding consistency in horses on farms using selective therapy in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 135 (3-4), 333-335.
- Nielsen, M.K., Monrad, J., Olsen, S.N. (2006b). Prescription-only anthelmintics - A questionnaire survey of strategies for surveillance and control of equine strongyles in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 135 (1), 47-55.
- Nielsen, M.K., Olsen, S.N., Lyons, E.T., Monrad, J., Thamsborg, S.M. (2012a). Real-time PCR evaluation of *Strongylus vulgaris* in horses on farms in Denmark and Central Kentucky. *Veterinary Parasitology*, 190 (3-4), 461-466.
- Nielsen, M.K., Olsen, S.N., Lyons, E.T., Monrad, J., Thamsborg, S.M. (2012b). Real-time PCR determination of *Strongylus vulgaris* in horses on farms with different anthelmintic regimens in Denmark and Central Kentucky. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S50-S51.
- Nielsen, M.K., Pfister, K., Von Samson-Himmelstjerna, G. (2014a). Selective therapy in equine parasite control - application and limitations. *Veterinary Parasitology*, 202 (3-4), 95-103.
- Nielsen, M.K., Reinemeyer, C.R., Donecker, J.M., Leathwick, D.M., Marchiondo, A.A., Kaplan, R.M. (2014b). Anthelmintic resistance in equine parasites - current evidence and knowledge gaps. *Veterinary Parasitology*, 204 (1-2), 55-63.
- Nielsen, M.K., Reist, M., Kaplan, R.M., Pfister, K., Van Doorn, D.C., Becher, A. (2014c). Equine parasite control under prescription-only conditions in Denmark - awareness, knowledge, perception, and strategies applied. *Veterinary Parasitology*, 204 (1-2), 64-72.

- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Gravatte, H.S., Bellaw, J., Lyons, E.T., Andersen, U.V. (2014d). Development of *Strongylus vulgaris*-specific serum antibodies in naturally infected foals. *Veterinary Parasitology*, 200 (3-4), 265-270.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Hanlon, B.M., Diao, G., Petersen, S.L., Kaplan, R.M. (2013b). Hierarchical model for evaluating pyrantel efficacy against strongyle parasites in horses. *Veterinary Parasitology*, 197 (3-4), 614-622.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Olsen, S.N.; Monrad, J., Thamsborg, S.M. (2012c). Selective therapy for strongyle parasite control: Reemergence of *Strongylus vulgaris*? *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S36-S37.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Olsen, S.N., Monrad, J., Thamsborg, S.M. (2012d) - *Strongylus vulgaris* associated with usage of selective therapy on Danish horse farms - is it reemerging? *Veterinary Parasitology*, 189 (2-4), 260-266.
- Nóvoa, M. (2002). *Raça Asinina de Miranda*. Relatório de Estágio da Licenciatura de Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Parque Natural do Douro Internacional. Instituto da Conservação da Natureza. 34 pp.
- O'Meara, B. & Mulcahy, G. (2002). A survey of helminth control practices in equine establishments in Ireland. *Veterinary Parasitology*, 109, 101-110.
- Ogbourne, C.P. (1978). Pathogenesis of cyathostome (*Trichonema*) infections of the horse. A review. Commonwealth Agricultural Bureaux, Commonwealth Institute of Parasitology, Miscellaneous publication N° 5. 25 pp.
- Ogbourne, C.P. & Duncan, J.L. (1985) - *Strongylus vulgaris* in the horse: its biology and veterinary importance. A Review. 2nd Ed., Commonwealth Agricultural Bureaux, Commonwealth Institute of Parasitology, Miscellaneous publication, N° 9, 68 pp.
- OMS - Organisation Mondiale de la Santé (2004). Changement climatique et santé humaine – Risques et mesures à prendre, Résumé. OMS, Genève, 37 pp.
- Orhan, Y., Saim, B., Mehmet, E. (2012). The domesticated donkey: I - Species characteristics. *Canadian Journal of Applied Sciences*, 4 (2), 339-353.
- Oryan, A., Kish, F.G., Rajabloo, M. (2015). Larval cyathostominosis in a working donkey. *Journal of Parasitic Diseases*, 39 (2), 324-327.
- Osman, A., Wang, C.K., Winter, A., Loukas, A., Tribolet, L., Gasser, R.B., Hofmann, A. (2012). Hookworm SCP/TAPS protein structure - A key to understanding host-parasite interactions and developing new interventions. *Biotechnology Advances*, 30 (3), 652-657.
- Osterman, L.E., Kuzmina, T., Ugglä, A., Waller, P.J., Höglund, J. (2007). A field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in Sweden. *Veterinary Research Communications*, 31, 53-65.

- Pandey, V.S. & Eysker, M. (1988). Parasites of the stomach in donkeys of the highveld of Zimbabwe. *Veterinary Quarterly*, 10 (4), 246-248.
- Paraud, C., Hoste, H., Lefrileux, Y., Pommaret, A., Paolini, V., Pors, I., Chartier, C. (2005). Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. *Veterinary Research*, 36, 157-166.
- Patterson, J.E.H., Ruckstuhl, K.E. (2013). Parasite infection and host group size: a meta-analytical review. *Parasitology*, 140, 803-813.
- Paul, J.W. (1998). Equine larval cyathostomosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 20, 509-514.
- Payne, S.E., Kotze, A.C., Durmic, Z., Vercoe, P.E. (2013). Australian plants show anthelmintic activity toward equine cyathostomins in vitro. *Veterinary Parasitology*, 196 (1-2), 153-160.
- Paz-Silva, A., Francisco, I., Valero-Coss, R.O., Cortiñas, F.J., Sánchez, J.A., Francisco, R. (2011a). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Veterinary Parasitology*, 179 (1-3), 277-282.
- Paz-Silva, A., Francisco, R., Rodríguez, I., Francisco, I., Cazapal-Monteiro, C. F., Arias, M. S., Suárez, J. L., Sánchez-Andrade, R. (2011b). Isolation of potentially useful antigens from cyathostomin third-stage larvae by using a fast protein liquid chromatography one-step method. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18 (9), 1462-1466.
- Peachey, L.E., Pinchbeck, G.L., Scantlebury, C.E., Tefera, G., Getachew, M., Etana, D., Burden, F.A., Trawford, A.F., Matthews, J.B., Hodgkinson, J.E. (2012). The evaluation of African and UK bioactive plant extracts for the control of equid gastrointestinal nematodes. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S37-S38.
- Pearson, R.A. & Ouassat, M. (1996). Estimation of the liveweight and body condition of working donkeys in Morocco. *The Veterinary Record*, 138 (10), 229-233.
- Pearson, R.A., Simalenga, T.E., Krecek, R. (2003). Harnessing and Hitching donkeys, horses and mules for work. University of Edinburgh, Center for Tropical Veterinary Medicine, Scotland, 34 pp.
- Peregrine, A.S., McEwen, B., Bienzle, D., Koch, T.G., Weese, J.S. (2006). Larval cyathostomiasis in horses in Ontario: An emerging disease? *Canadian Veterinary Medical*, 47 (1), 80-82.
- Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K. (2014). Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter? *Veterinary Parasitology*, 201 (1-2), 1-8.

- Pereira da Fonseca, I.M., Madeira de Carvalho, L.M. (2008). Influencia das alterações climáticas nos quadros epidemiológicos regionais das parasitoses dos pequenos ruminantes. IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias & I Congresso Ibérico de Epidemiologia. 27, 28 e 29 de Novembro de 2008, Santarém, Portugal, Livro de Resumos, pp 80.
- Pickles, R.S., Thornton, D., Feldman, R., Marques, A., Murray, D.L. (2013). Predicting shifts in parasite distribution with climate change: a multitrophic level approach. *Global Change Biology*, 19 (9), 2645-2654.
- Pietrement, H. (2004). Parasitisme digestif equin et modifications immunologiques. These n° 72 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, Ecole Nationale Veterinaire de Lyon. 187 pp.
- Pilo, C., Altea, A., Pirino, S., Nicolussi, P., Varcasia, A., Genchi, M., Scala, A. (2012). *Strongylus vulgaris* (Looss, 1900) in horses in Italy: is it still a problem? *Veterinary Parasitology*, 184 (2-4), 161-167.
- PNDI - Parque Natural do Douro Internacional (2007). Bioclima, geomorfologia, flora e fauna do Parque Natural do Douro Internacional. URL://www.rupicolas.com/portal/PT/66/default.aspx.
- Pôças, I.M.V.A. (2014). Os lameiros no contexto das paisagens de montanha. Monitorização por detecção remota em diferentes escalas espaço-temporais. Tese de Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciências Agrárias. Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 176 pp.
- Polidori, P. & Vincenzetti, S. (2012). Protein profile characterization of donkey milk. 215-232. In: Hurley, W.L. (Editor) Milk Protein. Chapter 8. InTech Publisher: Rijeka, Croatia.
- Polidori, P. & Vincenzetti, S. (2013) - Use of donkey milk in children with cow's milk protein allergy. *Foods*, 2, 151-159.
- Preto, E. & Sá, A. (2007). *Património geológico nos Parques Naturais do Douro Internacional e Arribas del Duero (Ramo Norte)*. Porto Editora. 28 pp.
- Pritchard, J.C. (2011). The role of working donkeys, mules and horses in the lives of women, children and other vulnerable groups: A review of literature. The Brooke, London, UK.
- Pritchard, J.C., Lindberg, A.C., Main, D.C.J., Whay, H.R. (2005). Assessment of the welfare of working horses, mules and donkeys, using health and behaviour parameters. *Preventive Veterinary Medicine*, 69 (3-4), 265-283.
- Proudman, C. & Matthews, J. (2000). Control of intestinal parasites in horses. *In Practice*, 22 (2), 90-97.

- Proudman, C.J., Ellis, R.N.W. (1995). Tapeworm infection in donkeys. *Veterinary Record*, 18, 475.
- Quaresma, M., Nóvoa, M., Monteiro, A., Almeida, J.M., Portas, M. (2005). A Raça Asinina de Miranda. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100 (555-556), 227-231.
- Rahman, S.A. & Reed, K. (2014). The management and welfare of working animals: identifying problems, seeking solutions and anticipating the future. *Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics*, 33 (1), 197-202.
- Ram, J.J., Padalkar, R.D., Anuraja, B., Hallikeri, R.C., Deshmanya, J.B., Neelkanthayya, G., Sagar, V.V. (2004). "Nutritional requirement of adult donkeys (*Equus asinus*) during work and rest". *Tropical Animal Health and Production*, 36, 407-412.
- Ramsey, Y.H., Christley, R.M., Matthews, J.B., Hodgkinson, J.E., McGoldrick, J., Love, S. (2004). Seasonal development of *Cyathostominae* larvae on pasture in a northern temperate region of the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 119, 307-318.
- Ras-Noryńska, M. & Sokół, R. (2013). Treatment of cyathostomiasis with ivermectin and its influence on selected blood biochemical parameters. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16 (3), 483-486.
- Regan, F.H., Hockenhull, J., Pritchard, J.C., Waterman-Pearson, A.E., Whay, H.R. (2014). Behavioural repertoire of working donkeys and consistency of behaviour over time, as a preliminary step towards identifying pain-related behaviours. *PLOS ONE*, 9(7): e101877. doi:10.1371/journal.pone.0101877
- Rehbein, S., Visser, M., Winter, R. (2013). Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. *Parasitology Research*, 112 (1), 407-413.
- Reinemeyer, C.R. (1986). Small strongyles. Recent advances. 281-312. In: HERD, R.P. (Ed.) *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, Parasitology*, 2 (2), 263-463.
- Reinemeyer, C.R. (2012). Anthelmintic resistance in non-strongylid parasites of horses. *Veterinary Parasitology*, 185 (1), 9-15.
- Reinemeyer, C.R., Nielsen, M.K. (2009). Parasitism and colic. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 25, 233-245.
- Reinemeyer, C.R., Nielsen, M.K. (2013). Handbook of equine parasite control. JOHN WILEY & SONS (Ed), Blackwell Publishing, Oxford, UK. 222 pp.
- Relf, V.E., Lester, H.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B. (2014). Anthelmintic efficacy on UK Thoroughbred stud farms. *International Journal for Parasitology*, 44, 507-514.
- Relf, V.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B. (2012). A questionnaire study on parasite control practices on UK breeding thoroughbred studs. *Equine Veterinary Journal*, 44, 466-471.

- Relf, V.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B. (2013). Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology*, 140 (5), 641-652.
- Ríos-Centeno, A., Maure, P., Perez, C.J., Braun, M. (1997). Survival of infecting (L3) larvae of *Cyathostominae* under extreme temperature and humidity. 16th Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology Workshop, 10-15 August 1997, Sun City, South África, Abst. 275, pp. 72.
- Robert, M., Hu, W., Nielsen, M.K., Stowe, C.J. (2014). Attitudes towards implementation of surveillance-based parasite control on Kentucky Thoroughbred farms - current strategies, awareness, and willingness-to-pay. *Equine Veterinary Journal*, Sep 5. doi: 10.1111/evj.12344.
- Rocque, S., Rioux, J.A., Slingenbergh, J. (2008). Climate change: Effects on animal disease systems and implications for surveillance and control. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 27, 339-354.
- Romero, H.Q. (1988). Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Primera Edición, Editorial Limusa, México. 876 pp.
- Ronchi, B., Nardone, A. (2003). Contribution of organic farming to increase sustainability of Mediterranean small ruminants livestock systems. *Livestock Production Science*, 80, 17-31.
- Rose, H., Hoar, B., Kutz, S.J., Morgan, E.R. (2014). Exploiting parallels between livestock and wildlife: Predicting the impact of climate change on gastrointestinal nematodes in ruminants. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3, 209-219.
- Rose, M.A., Round, M.C., Beveridge, W.I.B. (1970). Influenza in horses and donkeys in Britain. *Veterinary Record*, 86, 768-769.
- Rose, P., Cannas, E., Cantiello, P.R. (2011). Donkey-assisted rehabilitation program for children: a pilot study. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 47 (4), 391-396.
- Rossano, M.G., Smith, A.R., Lyons, E.T. (2010). Shortened strongyle-type egg reappearance periods in naturally infected horses treated with moxidectin and failure of a larvicidal dose of fenbendazole to reduce fecal egg counts. *Veterinary Parasitology*, 173, 349-352.
- Samões, L.M.R. (2000). *Estudo do gado asinino no Parque Natural do Douro Internacional*. Instituto da Conservação da Natureza, Parque Natural do Douro Internacional. 87 pp.
- Sargison, N.D., Wilson, D.J., Bartley, D.J., Penny, C.D., Jackson, F. (2007). Haemonchosis and teladorsagiosis in a Scottish sheep flock putatively associated with the overwintering of hypobiotic fourth stage larvae. *Veterinary Parasitology*, 147, 326-331.
- Saul, C., Siefert, L., Opuda-Asibo, J. (1997). Disease and health problems of donkeys: a case study from eastern Uganda. Reader for ATNESA workshop, 5-9 May 1997, Debre Zeit, Ethiopia, 58-63.

- Scantlebury, C.E., Peachey, L., Hodgkinson, J., Matthews, J.B., Trawford, A., Mulugeta, G., Tefera, G., Pinchbeck, G.L. (2013). Participatory study of medicinal plants used in the control of gastrointestinal parasites in donkeys in Eastern Shewa and Arsi zones of Oromia region, Ethiopia. *Veterinary Research*, 9:179. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/179>
- Scháňková, Š., Maršálek, M., Wagnerová, P., Langrová, I., Starostová, L., Stupka, R., Navrátil, J., Brožová, A., Truněčková, J., Kudrnáčová, M., Jankovská, I., Vadlejch, J., Čadková, Z., Křivská, D. (2014). Arrested development of experimental Cyathostominae infections in ponies in Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 206 (3-4), 328-332.
- Schneider, S., Pfister, K., Becher, A.M., Scheuerle, M.C. (2014). Strongyle infections and parasitic control strategies in German horses - a risk assessment. *Veterinary Research*, 10 (262). doi:10.1186/s12917-014-0262-z.
- Scholler, M., Hagedorn, G., Rubner, A. (1999). A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia*, 51, 89-113.
- Seri, H.I., Hassan, T., Salih, M.M., Abakar, A.D. (2004). A survey of gastrointestinal nematodes in donkeys (*Equus asinus*) in Khartoum State, Sudan. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3 (11), 736-739.
- Sewell, M.M.H. (1991). Uniformity and contrast of helminth diseases in equids. 141–150. In: Fielding, D. & Pearson, R.A. (Eds.), *Donkeys Mules and Horses in Tropical Agricultural Development*. Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom. 333 pp.
- Shalaby, H.A. (2013). Anthelmintics resistance; how to overcome it?. *Iranian Journal of Parasitology*, 8 (1), 18-32.
- Sheferaw, D., Alemu, M. (2015). Epidemiological study of gastrointestinal helminths of equines in Damot-Gale district, Wolaita zone, Ethiopia. *Journal of Parasitic Diseases*, 39 (2), 315-320.
- Shrikhande, G.B., Rewatkar, S.G., Deshmukh, S.S., Maske, D.K., Raghorde, Y.M. (2009). The incidence of helminth parasites in donkeys. *Veterinary World*, 2 (6), 224.
- Sievers, G., Quintana, I., Anticevic, S., Patiño, M., Gallardo, C. (1995). Desarrollo, traslación y sobrevivencia de larvas de strongilidos del equino en el ambiente natural en Valdivia, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 27 (1), 35-44.
- Slocombe, J.D., Gannes, R.V.G., Lake, M.C. (2007). Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4), 371-376.
- Smith, D., Wood, S. (2008). Donkey nutrition. 10-27. In: *The professional handbook of the donkey*. DUNCAN, J.; HADRILL, D. (Editors). Fourth edition. Compiled for Donkey Sanctuary by Elisabeth D. Svendsen. Wales. U.K., 438 pp.

- Soulsby, E.J.L. (1986). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. 4th Ed., Baillière Tindall, London, G.B., 809 pp.
- Sousa, S. & Madeira de Carvalho, L.M. (2009). Parasitismo intestinal numa população de asininos com desparasitação regular. (2009). XI Congresso Ibérico de Parasitologia 15 a 18 de Setembro de 2009. Universidade Nova de Lisboa - IHMT, Lisboa. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 16 (1/2), 220-221.
- Sousa, S., Rodrigues, J., Silva, A., Pimentel, M., Madeira de Carvalho, L.M. (2008). Infecção parasitária dos asininos da raça de Miranda em 2005 e 2008. Livro de Resumos do IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias & I Congresso Ibérico de Epidemiologia. 27, 28 e 29 de Novembro de 2008, Santarém, Portugal. pp. 117.
- Starkey, P. (1997). Donkey Work. In: *The Professional handbook of the Donkey: Compiled for the Donkey Sanctuary*. Svendsen E.D. (Ed.), Whitted Books. 11, 183-206 pp.
- Starkey, P., Ríos, A., Valdés, H., Sotto, P. (2002). The importance of horses, mules and donkeys in modern Cuba. <http://www.recta.org/pdf/horses-mules-donkeys-in-Cuba-Starkey-Rios-Valdes-Sotto.pdf>
- Stone, D.A., Allen, M.R., Stott, P.A., Pall, P., Min, S.K., Nozawa, T., Yukimoto, S. (2009). The detection and attribution of human influence on climate. *Annual Review of Environment and Resources*, 34, 1-16.
- Stratford, C.H., Lester, H.E., Pickles, K.J., McGorum, B.C., Matthews, J.B. (2014). An investigation of anthelmintic efficacy against strongyles on equine yards in Scotland. *Equine Veterinary Journal*, 46, 17-24.
- Stringer, A.P. (2014). Infectious diseases of working equids. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 30 (3), 695-718.
- Studzińska, M.B., Tomczuk, K., Demkowska-Kutrzepa, M., Szczepaniak, K. (2012). The Strongylidae belonging to Strongylus genus in horses from southeastern Poland. *Parasitology Research*, 111, 1417-1421.
- Svendsen, E.D. (1991) - Work to improve conditions of donkeys and mules world-wide. 181–188. In: Fielding, D., Pearson R.A. (Eds.), *Donkeys Mules and Horses in Tropical Agricultural Development*. Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom, 333 pp.
- Svendsen, E.D. (1997). *The professional handbook of the donkey*. Whittet Books, England. 400 pp.
- Swann, W.J. (2006). Improving the welfare of working equine animals in developing countries. *Applied Animal Behaviour Science*, 100 (1-2), 148-151.
- Tavela, A.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Araujo, J.M. (2011). Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 175 (1-2), 92-96.

- Tavela, A.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Silveira, W.F., Silva, V.H.D., Carretta-Júnior, M., Borges, L.A., Araujo, J.M., Benjamin, L.A., Carvalho, G.R., Paula, A.T. (2013). Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Research in Veterinary Science*, 94 (3), 568-572.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology*. Third Edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 874 pp.
- Tesfaye, A., CURRAN, M. (2005). A longitudinal survey of market donkeys in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 37, 87-100.
- Tesfu, N., Asrade, B., Abebe, R., Kasaye, S. (2014). Prevalence and risk factors of gastrointestinal nematode parasites of horse and donkeys in Hawassa Town, Ethiopia. *Veterinary Science & Technology*, 5 (5), 210. doi:10.4172/2157-7579.1000210
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J. (1986). *Diagnóstico de las helminthiasis por medio de examen coprológico*. 2ª Edition. Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica, 205 pp.
- Tolliver, S.C., Lyons, E.T., Drudge, J.H. (1985). Species of small strongyles and other internal parasites recovered from donkeys at necropsy in Kentucky. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 52 (2), 260-265.
- Toscan, G., Cezar, A.S., Pereira, R.C., Silva, G.B., Sangioni, L.A., Oliveira, L.S., Vogel, F.S. (2012). Comparative performance of macrocyclic lactones against large strongyles in horses. *Parasitology International*, 61 (4), 550-553.
- Traversa, D., Castagna, G. (2012). Anthelmintic resistance in horse cyathostomins in France. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S52.
- Traversa, D., Castagna, G., Von Samson-Himmelstjerna, G., Meloni, S., Bartolini, R., Geurden, T., Pearce, M.C., Woringer, E., Besognet, B., Milillo, P., D'espois, M. (2012). Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. *Veterinary Parasitology*, 188 (3-4), 294-300.
- Traversa, D., Iorio, R., Klei, T.R., Kharchenko, V.A., Gawor, J., Otranto, D., Sparagano, O.A. (2007a). New method for simultaneous species-specific identification of equine strongyles (nematoda, strongylida) by reverse line blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9), 2937-2942.
- Traversa, D., Klei, T.R., Iorio, R., Paoletti, B., Lia, R.P., Otranto, D., Sparagano, O.A.E., Giangaspero, A. (2007b). Occurrence of anthelmintic resistant equine cyathostome populations in central and southern Italy. *Preventive Veterinary Medicine*, 82 (3-4), 314-320.

- Traversa, D., Regalbono, A.F., Otranto, D., Lia, R.P., Beraldo, P., Cesare, A., Besognet, B., Geurden, T. (2012). Equine strongylid egg re-appearance period after ivermectin or moxidectin treatment in Italy. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S44-S43.
- Traversa, D., Von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Milillo, P., Schürmann, S., Barnes, H., Otranto, D., Perrucci, S., Regalbono, A.F., Beraldo, P., Boeckh, A., Cobb, R. (2009). Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasites & Vectors*, 2 (Suppl 2): S2. doi:10.1186/1756-3305-2-S2-S2
- Trawford, A. & Mulugeta, G. (2008). Parasites. Pp 82-110. In: The professional handbook of the donkey. Duncan, J., Hadrill, D. (Editors). Fourth edition. Compiled for Donkey Sanctuary by Elisabeth D. Svendsen. Wales. U.K. 438 pp.
- Trawford, A.F. & Burden, F.A. (2012). Drug resistant cyathostomins in donkey herds; lessons in management for all equids. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S43.
- Tsegaye, B., Chala, A. (2015). Prevalence of endoparasitic helminths of donkeys in and around Haramaya district, Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 7 (6), 221-224.
- Uhlinger, C.A. (1991). Equine small strongyles: epidemiology, pathology, and control. *Compendium*, 13, 863-869.
- Umur, S., Acici, M. (2009). A survey on helminth infections of equines in the Central Black Sea Region, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 33 (5), 373-378.
- UN - United Nations (2014). Goal 7: Ensure environmental sustainability. 41-49. In: UNITED NATIONS (Editor). The Millennium Development Goals Report 2014. New York. 56 pp.
- UNFCCC - United Nations Framework Convention on Climate Change (2007). Climate change: impacts, vulnerabilities and adaptation in developing countries. Bonn, Germany. 64 pp.
- Upjohn, M.M., Pfeiffer, D.U., Verheyen, K.L. (2014). Helping working Equidae and their owners in developing countries: monitoring and evaluation of evidence-based interventions. *The Veterinary Journal*, 199 (2), 210-216.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. (1987). Veterinary Parasitology. 1st Ed., Longman Scientific and Technical, Longman Group Ltd, U.K., 286 pp.
- Uslu, U., Guçlu, F. (2007). Prevalence of endoparasites in horses and donkeys in Turkey. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51, 237-240.

- Valdéz-Cruz, M.P., Hernández-Gil, M., Galindo-Rodríguez, L., Alonso-Díaz, M.A. (2013). Gastrointestinal nematode burden in working equids from humid tropical areas of central Veracruz, Mexico, and its relationship with body condition and haematological values. *Tropical Animal Health and Production*, 45 (2), 603-607.
- Valette, D. (2014). Invisible Helpers: Women's views on the contributions of working donkeys, horses, and mules to their lives. Key findings from research in Ethiopia, Kenya, India and Pakistan. *In: Voices from Women. International Report.* The Brooke, London, UK. 46 pp.
- Van Dijk, L. (2011). Socio-cultural and environmental impact of working animals on livelihoods. Expert meeting on the role, impact and welfare of working (transport and traction) animals. FAO/The Brooke, Rome, Italy. 24 pp.
- Van Dijk, L., Pritchard, J.C, Pradhan, S.K., Wells, K. (2011). Participatory action tools for animal welfare. 139-235. *In: Sharing the Load: A guide to improving the welfare of working animals through collective action, Practical Action.* UK.
- Van Doorn, D.C.K., Kooyman, F.N.J., Ploeger, H.W., Eysker, M., Wagenaar, J.A. (2012). Differentiation of cyathostomin species from horses with shortened egg reappearance period after treatment with ivermectin. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S43-S44.
- Van Kolk, J. H., Kroeze, E.J.B.V. (2013). Infectious Diseases of the Horse. Diagnosis, pathology, management, and public health. Manson Publishing, London, UK. ISBN: 978-1-84076-165-8, 336 pp. Chapter 6: Helminthic diseases (217-261 p)
- Van Wyk, J.A. (2001). Refugia - overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68, 55-67.
- Van Wyk, J.A., Cabaret, J., Michael, L.M. (2004). Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, 119, 277-306.
- Van Wyk, J.A., Hoste, H., Kaplan, R.M., Besier, R.B. (2006). Targeted selective treatment for worm management - how do we sell rational programs to farmers?. *Veterinary Parasitology*, 139, 336-346.
- Vázquez, I.F. (2010). Epidemiología y control de los principales parasitismos del caballo en Galicia, Universidade de Santiago de Compostela, Facultade de Veterinaria de Lugo. 225 pp.
- Vidyashankar, A.N., Hanlon, B.M., Kaplan, R.M. (2012). Statistical and biological considerations in evaluating drug efficacy in equine strongyleparasites using fecal egg count data. *Veterinary Parasitology*, 185 (1), 45-56.

- Vilà, C., Leonard, J.A., Beja-Pereira, A. (2006). Genetic documentation of horse and donkey domestication. 342-353. *In*: Zeder, M.A., Emshwiller, E., Smith, B.D., Bradley, D.G. (Editors). Documenting domestication: new genetics and archaeological paradigms. California, USA. University of California Press. 375 pp.
- Vilstrup, J.T., Seguin-Orlando, A., Stiller, M., Ginolhac, A., Raghavan, M., Nielsen, S.C.A., Weinstock, J., Froese, D., Vasiliev, S.K., Ovodov, N.D., Clary, J., Helgen, K.M., Fleischer, R.C., Cooper, A., Shapiro, B., Orlando, L. (2013). Mitochondrial Phylogenomics of Modern and Ancient Equids. *PLOS ONE*, 8(2): e55950. doi:10.1371/journal.pone.0055950
- Völlger, M., Demeler, J., Lämmer, M., Von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). Parasitological, clinical and serological examinations on the progress of *Parascaris equorum* infections in foals. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (10S), S45.
- Von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Veterinary Parasitology*, 185 (1), 2-8.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., Fritzen, B., Demeler, J., Schürmann, S., Rohn, K., Schnieder, T., Epe, C. (2007). Case of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Veterinary Parasitology*, 144, 74-80.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., Traversa D., Demeler, J., Rohn, K., Milillo, P., Schurmann, S., Lia, R., Perrucci, S., Regalbono, A.F., Beraldo, P., Barnes, H., Cobb, R., Boeckh, A. (2009). Effects of worm control practices examined by a combined faecal egg count and questionnaire survey on horse farms in Germany, Italy and the UK. *Parasites & Vectors*, 2 (Suppl 2): S3. doi:10.1186/1756-3305-2-S2-S3
- Waller, P.J. (1999). International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, 29, 155-164.
- Waller, P.J., Thamsborg, M. (2004). Review: Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends in Parasitology*, 20 (10), 493-497.
- Wannas, H.Y., Dawood, K.H.A., Gassem, G.H.A. (2012). Prevalence of gastro-intestinal parasites in horses and donkeys in Al-Diwaniyah Governorate. *AL-Qadisiya Journal of Veterinary Medicine Science*, 11 (1), 148-155.
- Waqas, M., Khan, M.S., Durrani, A.Z., Khan, M.A., Avais, M., Khan, S.A., Rehman, S.U., Hussain, A., Nasir, A., Hussain, A., Santos, F.C. (2014). prevalence of gastrointestinal parasites, chemotherapy and haematology of strongylosis in donkeys of district Lahore, Pakistan. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (7), 198-207.
- Waqas, M., Nawaz, M.S., Sajid, M., Ahmad, Z., Mushtaq, A., Jabbar, A., Zubair, M. (2015). strongylosis (red worms infestation); a potential threat to donkey's health and performance. *Global Veterinaria*, 14 (3), 345-350.

- Warnick, L.D. (1992). Daily variability of equine fecal strongyle egg counts. *The Cornell Veterinarian*, 82 (4), 453-463.
- Wells, D., Krecek, R.C., Wells, M., Guthrie, A.J., Lourens, J.C. (1998). Helminth levels of working donkeys kept under different management systems in the Moretele 1 district of the North-West Province, South Africa. *Veterinary Parasitology*, 77, 163-177.
- Whitfield, P.J. (1996). Parasitic helminths. 24-52. *In: Modern Parasitology, A Textbook of Parasitology*. Cox, F.E.G. (Ed.), 2nd Edition, Blackwell Science, London, United Kingdom, 276 pp.
- WHW - World Horse Welfare (2015a). Key problems for equidae. 65-77. *In: Removing the Blinkers: The Health and Welfare of European Equidae in 2015*. Chapter three. A World Horse Welfare and Eurogroup for Animals report. 123 pp.
- WHW - World Horse Welfare (2015b). The equid in legislation. 46-64. *In: Removing the Blinkers: The Health and Welfare of European Equidae in 2015*. Chapter two. A World Horse Welfare and Eurogroup for Animals report. 123 pp.
- WHW - World Horse Welfare (2015c). The size and scope of the equine sector. 15-45. *In: Removing the Blinkers: The Health and Welfare of European Equidae in 2015*. Chapter one. A World Horse Welfare and Eurogroup for Animals report. 123 pp.
- Wolf, D., Hermosilla, C., Taubert, A. (2014). *Oxyuris equi*: lack of efficacy in treatment with macrocyclic lactones. *Veterinary Parasitology*, 201 (1-2), 163-168.
- Wood, E.L., Matthews, J.B., Stephenson, S., Slote, M., Nussey, D.H. (2013). Variation in fecal egg counts in horses managed for conservation purposes: individual egg shedding consistency, age effects and seasonal variation. *Parasitology*, 140 (1), 115-128.
- WORMS (2014) - Nematoda. World list of free-living nematodes. *In: Costello, M.J., Bouchet, P., Boxshall, G., Arvantidis, C., Appeltans, W. (Eds), European Register of Marine Species*, accessed through PESI at <http://www.eu-nomen.eu/portal/taxon.php?GUID=urn:lsid:marinespecies.org:taxname:799>
- Yilma, J.M., Feseha, G., Svendsen, E.D., Mohammed, A. (1991). Health problems of working donkeys in Debre Zeit and Menagesha Regions of Ethiopia. 151-155. *In: Fielding, D., Pearson, R.A. (Eds.), Donkeys, mules and horses in tropical agricultural development. Proceedings of a colloquium held 3-6 September 1990, Edinburgh, Scotland*. Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, United Kingdom. 336 pp.
- Yilmaz, O., Wilson, R.T. (2013). The domestic livestock resources of Turkey: notes on donkeys. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23 (2), 651-656.
- Yoseph, S., Smith, D.G., Mengistu, A., Teklu, F., Firew, T., Betere, Y. (2005). Seasonal variation in the parasite burden and body condition of working donkeys in east shewa and west shewa regions of Ethiopia. *Journal of Tropical Animal Health and Production*, 37, 35-45.

- Zajac, A., Conboy, G. (2012). Fecal examination for the diagnosis of parasitism. 3-164. *In*: Zajac, A., Conboy, G., Greiner, E., Smith, S., Snowden, K. (Eds.), *Veterinary Clinical Parasitology*, Eighth Edition. American Association of Veterinary Parasitologists, Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, USA, 450 pp.
- Zewdie, B., Welday, K., Pal, S. (2015). Conservation of indigenous donkey breeds of ethiopia: a review. *International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies*, 2 (6), 13-22.

VI. ANEXOS

ANEXO I - Inquérito epidemiológico.

PROCESSO NÚMERO _____ DATA _____

Proprietário _____

Morada _____ Localidade _____

Telefone _____ Outro contacto _____

Características do animal

Número de identificação _____ Nome _____

Raça	
Sexo	
Idade	
Aptidão	
Condição corporal*	
Estado fisiológico	

* Escala de 1; 2 a 2,5; 3 a 3,5 e 4 a 5

Notas

Características da exploração

Centro de recuperação		
Actividade	Ensino	
	Apoio a deficientes	
Número de animais	1 a 5	
	> 5 a 15	
	> 15	

Notas

Características do manejo da exploração

Alimento	Tipo
	Origem
	Forma (comedouros ...)
Água	Origem
Estabulação	Sim
	Não
Camas	Material
	Maneio
Acesso à pastagem	Sim
	Não
	Época de pastoreio

Notas

Características do manejo sanitário

Desparasitação	Substâncias activas usadas	
	Altura do ano	
Outras técnicas de terapêutica/profilaxia antiparasitária		
Profilaxia das doenças infecto-contagiosas (vacinação)		

Notas

ANEXO II - Método de McMaster modificado.

Diagnóstico de parasitismo intestinal e determinação do número de ovos por grama de fezes pelo método de McMaster modificado por Thienpont *et al.* (1986), referido por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b).

1. Colocar duas gramas de fezes homogeneizadas num copo de plástico descartável de 90 mililitros.
2. Medir 28 mililitros de solução densa de açúcar (densidade de 1.20*) em proveta graduada.
3. Adicionar pouco a pouco os 28 mililitros de solução densa de açúcar à amostra de fezes e diluir a amostra até formar uma suspensão fecal.
4. Filtrar a suspensão fecal através de um tamis de forma a reter os detritos de maior volume.
5. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur transferir a suspensão fecal filtrada para a câmara de McMaster em acrílico com lâmina superior removível, de forma a encher as duas células de contagem. A suspensão fecal deve ser introduzida lentamente e de forma a não formar bolhas de ar.
6. Colocar a câmara de McMaster cheia sobre a platina do microscópio e deixar repousar cerca de dez minutos de forma a deixar estabilizar a preparação.
7. Observar ao microscópio ótico (Olympus CH20) com baixas ampliações, de 100 e 400 vezes, e proceder à contagem de todos os ovos tipo *estrongilídeo* nas duas células de contagem.
8. Considerar negativas as amostra com valores inferiores a 50 OPG e positivas as com valores iguais e superiores a 50 OPG.
9. Calcular o número de ovos por grama de fezes (OPG), segundo a fórmula indicada (n° ovos contados x 50) ou (média do n° ovos contados x 100).

* Preparação da solução de açúcar a 1.20 de gravidade específica, segundo Kassai (1999):

Dissolver 500 gramas de açúcar granulado em um litro de água destilada, adicionar seis mililitros de formaldeído a 37%.

ANEXO III - Método de coprocultura modificado.

Coprocultura pelo método de Roberts & O'Sullivan (1950) modificado por Ueno & Gutierrez (1983) e Madeira de Carvalho (1991), referido por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007b, 2008).

1. Macerar a amostra de fezes de forma a homogeneizá-la e a melhorar a sua consistência e arejamento. A consistência deve tornar-se friável e esponjosa.
2. Identificar um copo de plástico descartável de 200 mililitros.
3. Colocar cerca de 50 a 60 gramas de fezes no copo e realizar um orifício em profundidade no centro da amostra de forma a aumentar a sua área de superfície exposta ao oxigénio.
4. Cortar uma folha de alumínio com cerca de 10cm² de área e perfurá-la com auxílio de uma tesoura/pinça.
5. Cobrir o copo com a folha de alumínio perfurada e com o auxílio de um borrifador humedecer a amostra.
6. Colocar no interior de uma estufa húmida (humidade relativa de 70 a 80%) e à temperatura de 26 a 28°C.
7. Incubar durante 14 dias com controlo diário da temperatura, humidade e arejamento da cultura, de forma a evitar a sua putrefacção e formação de fungos.

ANEXO IV - Técnica de recolha de larvas infetantes.

Recolha de larvas infetantes pela técnica de Roberts & O'Sullivan com modificações de Euzéby (1982), referidas por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007b, 2008).

1. Após o período de incubação retirar a coprocultura da estufa, destapar e colocar água de forma a submergi-la.
2. Colocar uma base de placa de Petri sobre a coprocultura imersa de forma a cobrir o copo.
3. Inverter a coprocultura de forma a não extravasar líquido para a base da placa de Petri e adicionar-lhe cerca de 15 a 20 mililitros de água.
4. Deixar repousar cerca de 24 horas.
5. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur recolher o líquido que se encontra na base da placa de Petri, onde se encontram concentradas as L3, e transfere-se o mesmo para tubos de centrífuga de dez mililitros.
6. Proceder à concentração das L3 por centrifugação a 1500rpm durante três minutos.
7. Cobrir os tubos de centrífuga com película de “Parafilm®” para reduzir a concentração de oxigénio.
8. Refrigerar a 4-5°C as larvas isoladas, até ao momento da sua observação e identificação.

ANEXO V - Técnicas de recuperação e observação de larvas infetantes.

Observação microscópia das larvas infetantes isoladas, segundo Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007b, 2008).

1. Para recuperar as L3 isoladas nos tubos de centrífuga é necessário eliminar cuidadosamente o sobrenadante e recuperar o sedimento com pipeta de Pasteur.
2. Colocar uma gota de sedimento sobre uma lâmina de vidro e adicionar com uma gota de Solutio de Lugol.
3. Com movimentos rotativos da lâmina promover a diluição do sedimento na solução iodada de forma a fixar e corar eficazmente as L3.
4. Fazer uma preparação lâmina-lamela evitando a formação de bolhas de ar.
5. Observar ao microscópio ótico na ampliação 40 e 100 vezes, realizando contagem e identificação de pelo menos 100 larvas do terceiro estágio de desenvolvimento.
6. Utilizar a chave dicotômica para identificação de L3 de nematodes comuns dos equídeos.

ANEXO VI - Chave dicotômica para identificação das larvas infetantes.

Identificação das larvas infetantes de acordo com as características morfológicas referidas na chave dicotômica adaptada de Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2004, 2007b, 2008).

Chave para identificação de alguns nematodes comuns dos equídeos.

1. Larvas sem bainha 2
Larvas com bainha 3
2. Esófago rãbitiforme (com bulbo), presença de machos, fêmeas e ovos Nematodes de vida livre
Esófago filariforme, superior a 1/3 do comprimento do corpo, cauda da larva termina em forma de “v” pequeno *Strongyloides westeri*
3. Cauda da bainha muito curta, 80 a 115µm do ânus à extremidade posterior da bainha, não apresentando forma de chicote, com comprimento total médio de 738,1µm *Trichostrongylus axei*
Cauda da bainha comprida ($\geq 175\mu\text{m}$) e em forma de chicote 4
4. Larvas de tamanho médio com 6 a 9 células intestinais, com comprimentos totais médios de 773,3 a 886µm 5
Larvas de tamanho pequeno a grande com mais de 9 células intestinais, comprimentos totais médios de 730,7 a 991,7µm 8
5. Larvas de tamanho médio com 8 células intestinais com organização e forma bem definidas, comprimentos totais médios de 812 a 848µm 6
Larvas de tamanho médio a grande com 6 a 9 células intestinais sem organização e forma definidas, comprimentos totais médios de 773,3 a 886µm 7
6. Larvas de dimensão média com 8 células intestinais, em que as duas primeiras (triangulares ou retangulares) formam uma fila dupla e as restantes seis (trapezoides ou retangulares) formam uma fila única, comprimento total médio de 811,9µm *Cyathostomum sensu lato* tipo A (2+6)
Larvas de dimensão média com 8 células intestinais triangulares ou pentagonais arranjadas em fila dupla, comprimento total médio de 828,1µm *Cyathostomum sensu lato* tipo B (4+4)

Larvas de dimensão média a grande com 8 células intestinais, em que as quatro primeira formam uma fila dupla (pentagonais, triangulares ou rectangulares) e as restantes quatro (trapezoidais) estão arranjadas em fila única, comprimentos total médio de 847,8µm
..... *Cyathostomum sensu lato* tipo C (2+2+4)

Larvas de dimensão média a grande com 8 células intestinais em fila única com forma trapezoidal ou triangular, comprimento total médio de 842,8µm
..... *Cyathostomum sensu lato* tipo D

7. Larvas de pequena dimensão com 6 células intestinais triangulares e/ou trapezoidais, com arranjo diverso, em fila dupla ou única, < comprimento total médio de 773,3µm
..... *Cyathostomum sensu lato* tipo E

Larvas de média dimensão com 7 células intestinais triangulares e trapezoidais alongadas. Arranjo diverso, 2 a 4 células em fila dupla e as restantes em fila única ou arranjo misto. Comprimento total médio de 824,2µm
..... *Cyathostomum sensu lato* tipo F

Larvas de média a grande dimensão com 8 células intestinais triangulares e/ou rectangulares (alongadas e estritas), trapezoidais (porção distal), arranjo diverso, comprimento total médio de 847,8µm *Cyathostomum sensu lato* tipo G

Larvas de grande dimensão com 9 células intestinais triangulares alongadas, as primeiras 6 em fila dupla e as restantes em fila única, > comprimento total médio deste grupo é de 886µm
..... *Cyathostomum sensu lato* tipo H

8. Larvas com 12 células intestinais arranjadas em fila dupla (células com forma rectangular e pentagonal), ou 6 a 10 células emparelhadas e as restantes em fila única (trapezoidal e triangular), com comprimento total médio de 730,7µm
..... *Gyalocephalus capitatus*

Larvas com mais de 12 células intestinais 9

9. Larvas com 16 células intestinais 10

Larvas com mais de 16 células intestinais 12

10. Larvas de dimensão média (comprimento médio de 785,7µm e largura média de 27,6µm), com células intestinais rectangulares e pentagonais, com proporção corpo da larva/porção distal (cl/pd) = 2,1:1 *Poteriostomum* spp.

Larva de dimensão grande 11

11. Larvas de grande dimensão (comprimento médio de 991,7µm e largura média de 34,5µm), com intestino longo (415µm) e com células grandes, distintas, de forma triangular, por vezes pentagonais alongadas, proporção cl/pd = 2,4:1
..... *Oesophagodontus robustus*

Larvas de grande dimensão (comprimento médio de 862,4µm e largura média de 29,2µm), com células rectangulares (células proximais em fila dupla), pentagonais e triangulares (células distais em posição intermédia ou com uma única célula terminal), proporção cl/pd = 1,8:1 *Craterostomum acuticaudatum*

Larvas de grande dimensão (comprimento médio de 907µm e largura média de 30,1µm), com células proximais rectangulares alongadas e as restantes pentagonais, as duas células distais assimétricas, uma com metade do comprimento da outra mas com terminação ao mesmo nível, proporção cl/pd = 1,7:1 *Triodontophorus serratus*

Larvas de grande dimensão e finas (comprimento médio de 901µm e largura média de 18,3µm), células intestinais pouco diferenciadas, transição pouco distinta entre o esófago e o intestino, cauda da larva com um lobo na extremidade, cauda da bainha curta, proporção cl/pd = 4,1:1 *Strongylus equinus*

12. Larvas com 18 a 20 células intestinais 13

Larvas com mais de 20 células intestinais 14

13. Larvas de pequena a média dimensão, finas (comprimento médio de 788,5µm e largura média de 22,5µm), com células intestinais triangulares estreitas e alongadas, mal definidas, esófago curto , proporção cl/pd = 2,2:1 *Strongylus edentatus*

Larvas de média a grande dimensão e grossas (comprimento médio de 834,2µm e largura média de 28,4µm), com células intestinais pentagonais (mais frequentes), rectangulares e triangulares (células distais justapostas ou em posição intermédia), esófago longo (cerca de 1/3 do comprimento do corpo da larva), proporção cd/pd = 2,1:1 *Triodontophorus* spp.*

14. Larvas de grande dimensão e grossas (comprimento médio de 935,6µm e largura média de 32,1µm), com células intestinais pentagonais e bem definidas e com coloração mais escura, esófago curto, proporção cd/pd = 2,8:1 *Strongylus vulgaris*

*Excepto *Triodontophorus serratus*

ANEXO VII - Técnica para amostragem e colheita de erva da pastagem.

Técnica do duplo W para amostragem e colheita de erva, adaptada de Taylor (1939), modificada por Ludwig & Johnstone (1984) e Madeira de Carvalho (1993), desenvolvida por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b).

1. Percorrer a área de pastagem, duas vezes e em sentido inverso, num trajeto em forma de W.
2. Em cada braço, dos dois W percorridos, colher amostra de erva em dez paragens equidistantes, num total de 80 pontos de colheita.
3. Em cada ponto colher cinco amostras com o polegar e o indicador: atrás, frente, esquerda, direita do ponto de paragem e entre os pés.
4. Fazer um total de 400 colheitas de erva, com um peso total entre 250 a 500 gramas.
5. Colher para sacos de polietileno, fechar e identificar.
6. Transportar para o laboratório refrigerado (4-5°C).

ANEXO VIII - Técnica para recuperar larvas infetantes da erva da pastagem.

Técnica de Gruner & Raynaud (1980) e Gettinby *et al.* (1985) modificada por Madeira de Carvalho (1993), desenvolvida por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b).

1. Colocar as amostras de erva em recipientes de plástico de dez litros e imergir com água da torneira à temperatura ambiente.
2. Adicionar três gotas de detergente (reduzir a tensão superficial), agitar e aguardar cerca de dez minutos.
3. Escorrer a água da lavagem para um recipiente e proceder a uma segunda lavagem com água corrente.
4. Escorrer a erva e centrifugar a 100rpm durante um minuto em centrífuga manual para vegetais. A erva depois de lavada vai secar na estufa a 80°C durante três dias para determinação do peso da erva seca em grama.
5. Filtrar a água obtida, das duas lavagens e centrifugação, através de filtros de malha com diâmetro decrescente, de 1000, 500, 250* e 20 micrómetros (Retsch®, de 20 centímetros de diâmetro).
6. Recuperar as larvas infetantes (L3), retidas no filtro de 20 micrómetros, por lavagem com água corrente e arrasto das L3 para copos de precipitação de 500 mililitros.
7. Concentrar as L3 transferindo-as para papel de filtro (Whatman® referência 113, com 15 centímetros de diâmetro) por vácuo (pressão de 250 milímetros de mercúrio).
8. Extrair as L3 dos detritos finos, em aparelho de Baermann ou copo cónico, e após 24 horas de permanência. Recuperar os dez mililitros de sedimento para tubo de centrífuga.

* Os filtros de malha com diâmetro de 250 micrómetros foram substituídos por filtros de 106 micrómetros.

ANEXO IX - Técnica de contagem das larvas infetantes na pastagem.

Técnica de contagem das larvas infetantes na pastagem, desenvolvida por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2007b).

1. Agitar o tubo de centrífuga de forma a suspender as L3 contidas em dez mililitros de suspensão aquosa.
2. Com micropipeta graduada (1000 microlitros) retirar uma alíquota de um mililitro da amostra homogeneizada.
3. Adicionar duas a três gotas de Solutio de Lugol e observar o volume da alíquota ao microscópio ótico a 40, 100 e 200 vezes.
4. Proceder à identificação das L3 de acordo com caracteres morfológicos referidos em chave dicotômica proposta por Madeira de Carvalho (2001) e Madeira de Carvalho *et al.* (2008) (Anexo VI).
5. Contar a totalidade das L3 presentes.
6. Calcular o número de L3 presentes nos dez mililitros de suspensão aquosa multiplicando por dez o número obtido.
7. Calcular o valor do número de L3, expresso por quilograma de erva seca (ES) através da seguinte fórmula: $N^{\circ}L3/Kg\ ES = [N^{\circ}\text{ total de L3 (10ml)} \times 1000] / \text{Peso erva seca (grama)}$

ANEXO X - Técnica de amostragem e colheita de palha e de feno.

Técnica de amostragem e colheita de palha das camas e da palha e feno utilizados na alimentação, referida por Madeira de Carvalho (2001).

1. Colher palha e aparas de madeira em diversos pontos das camas e em várias camadas, superficiais e profundas.
2. Proceder de forma idêntica, ao referido no ponto um, para colher palha e feno de manjedouras utilizadas para alimentação.
3. Colocar o material colhido em sacos de plástico, identificados e convenientemente acondicionados em malas térmicas.
4. Transportar para o laboratório à temperatura de refrigeração (4-5°C).

ANEXO XI - Técnica de McMaster para o estudo do nível de contaminação da palha e do feno.

Técnica de McMaster modificada por Fazendeiro (1989), referida por Madeira de Carvalho (2001) para o estudo do nível de contaminação da palha e do feno.

1. Cortar a amostra com tesoura até perfazer seis gramas.
2. Transferir para um copo e adicionar 54 mililitros de solução densa de açúcar (1.20).
3. Proceder ao diagnóstico e à contagem de parasitas pelo método de McMaster modificado referido no Anexo II.

Nota: Técnica com sensibilidade de 20 ovos por grama de conteúdo da cama ou alimento.