

Capítulo I

Introdução

Equinococose – hidatidose

1. Etiologia

A equinococose-hidatidose é uma zoonose parasitária provocada por *Echinococcus* spp., helmintes que afectam animais domésticos, silvestres e o Homem (Nakao et al., 2013). Os termos equinococose e hidatidose são utilizados distintamente para descrever a zoonose no hospedeiro definitivo e intermediário, respectivamente.

1.1. Taxonomia

1.1.1. *Echinococcus* spp.

O género *Echinococcus* pertence ao Filo Platyhelminthes, Classe Cestoda, Ordem Cyclophyllidea e à Família Taeniidae (Roberts & Janovy, 2009). A problemática da especiação e sub-especiação do género *Echinococcus* tem sido desde sempre controversa, não só no que respeita à nomenclatura, como ao número de supostas espécies (David de Moraes, 2011). A taxonomia de *Echinococcus* está em constante mudança (Romig et al., 2006). Segundo Moro & Schantz (2009), são reconhecidas 6 espécies distintas do género *Echinococcus*, mas apenas 4 constituirão um problema de saúde pública, sendo elas: *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus vogeli* e *Echinococcus oligarthrus*. Os mesmos autores citam o mais recente reconhecimento de duas novas espécies (*Echinococcus shiquicus* e *Echinococcus felidis*), ainda que o seu potencial zoonótico seja desconhecido. Nakao et al. (2013) referem já a existência de 9 espécies distintas no género: *Echinococcus granulosus sensu stricto*, *Echinococcus equinus*, *Echinococcus orteppi*, *Echinococcus canadensis* (o conjunto das anteriores são também designadas de *E. granulosus sensu lato*), *Echinococcus multiloculares*, *Echinococcus shiquicus*, *Echinococcus felidis*, *Echinococcus vogeli* e *Echinococcus oligarthrus*.

Echinococcus vogeli e *Echinococcus oligarthrus* são responsáveis pela hidatidose poliquística na América Central e do Sul (McManus et al., 2003, Somocurcio et al., 2004). As duas espécies mais importantes no domínio da saúde pública são *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*, agentes causadores da hidatidose quística e da hidatidose alveolar, respectivamente (Eckert et al., 2001, McManus et al., 2003). Embora seja rara,

está descrita a ocorrência simultânea no mesmo animal (neste caso, cão e gato) destas duas espécies de *Echinococcus* (Dyachenko et al., 2008). Cerca de 95% dos casos de hidatidose a nível mundial serão de hidatidose quística (Gorad et al., 2011). Neste trabalho, vamo-nos debruçar sobre *Echinococcus granulosus sensu lato*, uma vez que este terá sido identificado em 70% dos casos humanos portugueses (EFSA, 2009), e será o único agente indígena em Portugal (David de Moraes, 1998).

1.1.2. *Echinococcus granulosus* e seus genótipos

A classificação morfológica nem sempre possível, embora tenha sido criticada pelo facto de poder reflectir apenas adaptações fenotípicas a diferentes ecossistemas e não verdadeiras variações genotípicas (David de Moraes, 2011), graças à biologia molecular, revelou uma série de espécies adaptadas a distintos hospedeiros e genótipos que são mantidos em ciclos distintos de transmissão (Thompson, 2008). Assim, a aplicação de novas ferramentas no âmbito da biologia molecular permitiu evidenciar uma base genética para a variação fenotípica existente dos agentes etiológicos da hidatidose (McManus, 2013). Existem diferentes genótipos de *Echinococcus granulosus*, tendo sido identificados por análises de sequenciação de DNA mitocondrial 10 (G1-G10) (Craig et al., 2007). Os diferentes genótipos foram designados pela estirpe de acordo com o hospedeiro intermediário mais frequentemente afectado (Nakao et al., 2013). Estes incluem duas estirpes ovinas (G1 e G2), duas estirpes bovinas (G3 e G5), uma estirpe equina (G4), uma estirpe camelídea (G6), uma estirpe suína (G7), uma estirpe cervídea (G8), uma estirpe suína descrita na Polónia (G9) e finalmente uma estirpe de rena (G10) (Moro & Schantz, 2009) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Genótipos da espécie *Echinococcus granulosus*, seus hospedeiros e distribuição geográfica

Genótipo	Hospedeiros Intermediários	Hospedeiros Definitivos	Distribuição Geográfica	Referências Bibliográficas
G1 (estirpe ovina)	Ruminantes, Suídeos, Camelídeos, Macrópodes, Leporídeos	Cão, Lobo, Dingo, Chacal, Hiena e Raposa	Europa, Médio Oriente, África, Ásia, Austrália, América do Norte e do Sul	Eckert et al., 2001; Torgerson & Budke, 2003; Jenkins et al., 2005; Romig et al., 2006; Moro & Schantz, 2006; Thompson, 2008; David de Moraes, 2011; Boufana et al., 2012; McManus, 2013; Rojas et al., 2014
G2 (estirpe ovina da Tasmânia)	Ovinos	Cão e Raposa	Tasmânia, Ásia, América do Sul, África e Europa	Eckert et al., 2001; Torgerson & Budke, 2003; Romig et al., 2006; Moro & Schantz, 2006; Thompson, 2008; McManus, 2013; Rojas et al., 2014
G3 (estirpe do búfalo)	Búfalo, Bovinos e Ovinos	Cão e Raposa	Ásia, Europa e América do Sul	Eckert et al., 2001; Jenkins et al., 2005; Romig et al., 2006; Moro & Schantz, 2006; Thompson, 2008; CFSPH, 2011; McManus, 2013
G4 (estirpe equina - <i>Echinococcus equinus</i>)	Equídeos Primatas	Cão	Europa, Médio Oriente e África	Eckert et al., 2001; Jenkins et al., 2005; Romig et al., 2006; Thompson, 2008; McManus, 2013; Rojas et al., 2014
G5 (estirpe bovina - <i>Echinococcus ortleppi</i>)	Bovinos, Ovinos, Caprinos, Búfalos, Suídeos, Primatas Camelídeos	Cão e Chacal	Europa, África, Ásia e América do Sul	Eckert et al., 2001; Torgerson & Budke, 2003; Romig et al., 2006; Moro & Schantz, 2006; Thompson, 2008; CFSPH, 2011; Boufana et al., 2012; Ahmed et al., 2013; McManus, 2013; Rojas et al., 2014
G6 (estirpe camelídea)	Camelídeos, Bovinos, Ovinos, Caprinos, Suídeos	Cão	Médio Oriente, África, Ásia, América do Sul, Europa de Leste	Eckert et al., 2001; Torgerson & Budke, 2003; Romig et al., 2006; Moro & Schantz, 2006; Thompson, 2008; Bruzinskaite et al., 2009; CFSPH, 2011; McManus, 2013; Rojas et al., 2014
G7 (estirpe suína)	Suíno, Javali, Bovino, Ovinos, Caprinos, Roedores	Cão	Europa, América do Sul, México	Eckert et al., 2001; Torgerson & Budke, 2003; Romig et al., 2006; Moro & Schantz, 2006; Thompson, 2008; Bruzinskaite et al., 2009; McManus, 2013
G8 (estirpe cervídea)	Cervídeos	Cão e Lobo	América do Norte, Europa	Eckert et al., 2001; Hirvela-Koski et al., 2003; Torgerson & Budke, 2003; Romig et al., 2006; Thompson, 2008; CFSPH, 2011; McManus, 2013
G9 (estirpe suína polaca)	Suínos	Cão	Europa	Eckert et al., 2001; Torgerson & Budke, 2003; McManus, 2013
G10 (estirpe cervídea escandinava)	Cervídeos	Cão e Lobo	América do Norte e Europa (Norte)	Jenkins et al., 2005; Hirvela-Koski et al., 2003; Romig et al., 2006; Thompson, 2008; CFSPH, 2011; McManus, 2013

Echinococcus granulosus sensu lato inclui *Echinococcus granulosus sensu stricto* (cluster de genótipos G1, G2 e G3), *Echinococcus equinus* (G4),

Echinococcus orteppi (G5) e *Echinococcus canadensis* (G6-G10) (Snabel et al., 2009). Mais recentemente, Thompson & Jenkins (2014) associam a *E. canadensis* apenas os genótipos G8 e G10, representando *Echinococcus intermedius* os genótipos G6 e G7. A alocação dos genótipos às espécies existentes começa a ser cada vez mais difícil, porque existe uma muito maior variabilidade nos clusters do que a previamente reconhecida. Adicionalmente, para a maioria das estirpes a informação sobre dispersão geográfica, frequência em animais e humanos, variedade de hospedeiros e patogenia, ainda é insuficiente (Rojas et al., 2014).

Segundo Snabel et al. (2009) todos os genótipos são infecciosos para o Homem, contudo a maioria dos autores exclui *Echinococcus equinus* (McManus, 2013, Otero-Abad & Torgerson, 2013, Rojas et al., 2014). Boufana et al. (2012) descrevem o primeiro caso de hidatidose com o genótipo G4 num lêmur, o que pode deixar em aberto a possibilidade de no futuro se vir a detectar este genótipo também noutros Primatas. O genótipo G1, da estirpe ovina, é o mais cosmopolita e mais frequentemente associado à infecção humana (McManus et al., 2003), sendo responsável por 88.44% dos casos humanos a nível global (Rojas et al., 2014). O cluster de genótipos G6-G7 são responsáveis por 11.07% das infecções humanas globais, e destes, 7.34% referem-se a G6 (McManus, 2013). Os casos de hidatidose humana com os genótipos G5, G8 e G10 são raros (Rojas et al., 2014).

A presença do genótipo ovino G1 coincide com a elevada prevalência de hidatidose humana na mesma região (Romig et al., 2006). Apesar do genótipo ser designado de ovino, outras espécies podem ser portadoras e importantes na transmissão da doença ao Homem. Na Sardenha, Varcasia et al. (2006) encontraram suínos infectados com o genótipo G1, com quistos altamente férteis, pelo que foram considerados como animais que tem um papel muito importante na transmissão da doença aos cães, particularmente devido à prática de abate caseiro que existe nesta região.

Na Europa estão presentes todos os genótipos (Cardona & Carmena, 2013), mas o G5 de uma forma residual (Romig et al., 2006).

Na região do Mediterrâneo, os genótipos G1, G2, G3 e G4 já foram identificados em Itália, no Líbano e na Síria. O genótipo G7 está descrito em Espanha, Itália, Eslováquia, Polónia, Turquia e Portugal (Thompson & McManus, 2002, Mwambete et al., 2004, Bart et al., 2006, Varcasia et al., 2007, Beato et al.,

2013). Na Grécia estão identificados os genótipos G1 e G3 (Varcasia et al., 2007), na Sardenha os G1 e G7 (Varcasia et al., 2006) e na Córsega o G6/7 (Umhang et al., 2014). Em Espanha já foram identificados os genótipos G1 (em ovinos, bovinos, caprinos, suínos, javalis, lobos e humanos), G4 (em equídeos) e G7 (em caprinos, suínos e javalis) (Sobrino et al., 2006, Carmena et al., 2008, Martin-Hernando et al., 2008).

Em Portugal, e num estudo realizado no Alentejo, o genótipo identificado em humanos foi o G1 (David de Moraes, 2006). Em animais (amostras de ovinos e bovinos), na região Centro de Portugal, aparentemente predominam os genótipos G1 e G3 (Beato et al., 2010). Num estudo realizado por Castro et al. (2006), o genótipo G1 foi detectado em amostras de ovinos e bovinos recolhidas também na região Centro de Portugal, e o genótipo G7 em suínos de Vinhais. Beato et al. (2013) referem o genótipo G7 em bovinos, e Guerra et al. (2013) o mesmo genótipo em lobos ibéricos no Parque Nacional da Peneda Gerês.

Esta variação genética pode ter influência no ciclo biológico, na especificidade dos hospedeiros, na antigenicidade, na transmissão e na sensibilidade aos agentes quimioterápicos (Jenkins et al., 2005), assim como na patogenicidade para o Homem (Carmena et al., 2008). A título de exemplo podemos referir que há evidências de que o genótipo G6 tenha afinidade para o cérebro dos humanos (Sadjjadi et al., 2013). A identificação do genótipo poderá portanto ter implicações no desenvolvimento de vacinas, fármacos e de meios de diagnóstico (McManus, 2003; Craig et al., 2007). Thompson & McManus (2002), McManus et al. (2003) e Snabel et al. (2009) referem, por exemplo, que identificar o genótipo G7 em caprinos (tal como foi descrito no estudo de Varcasia et al., 2007) ou em ovinos, em vez do expectável G1, implica uma desparasitação mais regular dos carnívoros, devido a um período de desenvolvimento pré-patente mais curto deste genótipo. Já Bruzinskaite et al. (2009) defendem que a epidemiologia da estirpe G7 é caracterizada por um padrão de transmissão de “pequena escala” em quintas familiares onde se pratica o tradicional abate caseiro. O conhecimento crescente da estrutura genética do parasita pode providenciar mais informação acerca da sua epidemiologia e transmissão, já que a variação genética pode efectivamente afectar a infecciosidade e a patogenicidade (Ma et al., 2008).

1.2. Morfologia

Echinococcus spp. (Figura 1.1) apresenta algumas particularidades que o permite diferenciar do outro género da mesma família, o género *Taenia*, nomeadamente o facto do parasita adulto ser pequeno, medindo apenas alguns milímetros (dois a nove mm) apresentando um estróbilo com no máximo sete segmentos (Eckert et al., 2001, Bowman et al., 2004).



Figura 1.1 – Imagem microscópica do parasita adulto *Echinococcus*
(Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/gallery.html#adults>)

O escólex tem quatro ventosas e uma dupla fileira de 28 a 50 ganchos, tradicionalmente seguida de um pescoço, um proglótide em desenvolvimento, um maturo e um gravídico. O último segmento tem geralmente mais de metade do comprimento do cestode (CFSPH, 2011).

O ovo de *Echinococcus*, morfologicamente, não se distingue do de outros parasitas do género *Taenia* (Figura 1.2).



Figura 1.2 – Imagem microscópica de ovos Taeniidae (Original)

O ovo tem uma forma ovóide e mede 32-36 μm x 25-30 μm . É constituído pelo embrião hexacanto ou oncosfera, que se encontra envolvido pelo embrióforo que tem estriamento radial. A oncosfera tem três pares de ganchos que servem para perfurar a parede intestinal, chegando depois via sanguínea ou linfática ao órgão onde se irá desenvolver o quisto hidático (Eckert et al., 2001, Taylor et al., 2007).

Os quistos de *Echinococcus granulosus* desenvolvem-se nos órgãos dos hospedeiros intermediários como vesículas uniloculares em forma de “bexiga”, cheias de líquido (Figura 1.3).

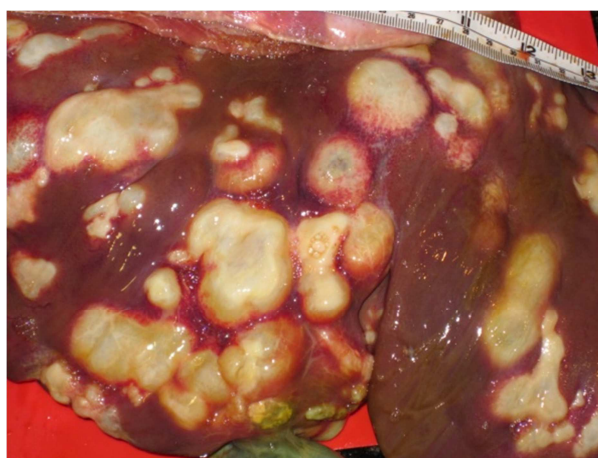


Figura 1.3 - Quistos hidáticos em fígado de ovino (Original)

Os quistos hidáticos (Figura 1.4) são constituídos por duas membranas de origem parasitária e uma produzida pelo hospedeiro (do interior para o exterior) (Gottstein et al., 2002, McManus et al., 2003, Zhang et al., 2003):

- membrana germinativa, é nucleada e a partir da qual são geradas por reprodução assexuada as vesículas filhas e os protoescólices;
- membrana laminada ou cutícula, é acelular, forma-se duas a quatro semanas após a infecção do hospedeiro intermediário e terá como função principal a protecção
- membrana adventícia, que é uma cápsula fibrosa produzida pelo hospedeiro.

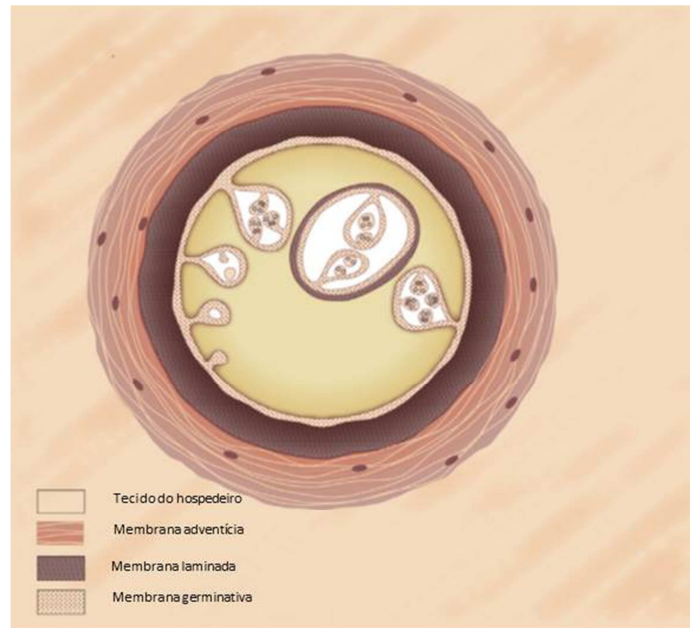


Figura 1.4 – Diagrama ilustrando a estrutura do quisto hidático
(Adaptado de: Thompson & Jenkins, 2014)

1.3. Ciclo de vida

O agente etiológico *Echinococcus* spp. é um cestode que vive no intestino delgado (especialmente no primeiro terço) de carnívoros domésticos e selvagens, sobrevivendo no seu interior até três anos (CFSPH, 2011). Cerca de quatro a cinco semanas após a infecção do hospedeiro definitivo, os parasitas adultos presentes no intestino começam a produzir ovos que são libertados no ambiente com as fezes dos carnívoros (hospedeiros definitivos) (Zhang et al., 2003). O número de parasitas no intestino pode passar os 1000, e cada um pode produzir entre 34-58 ovos diariamente (Eckert et al., 2001). Os ovos de *Echinococcus granulosus* quando eliminados nas fezes podem permanecer viáveis no ambiente durante dois anos (Taylor et al., 2007), podendo inclusivamente resistir a temperaturas entre os -30°C e os 30°C (Mas-Coma et al., 2008). Um estudo demonstrou que fezes com ovos de *Echinococcus* deixadas no ambiente durante 41 meses, após esse tempo, os ovos ainda eram capazes de gerar quistos hidáticos em ovelhas (Thevenet et al., 2005). As fezes levam a contaminação ambiental – da superfície do solo, dos pastos, água e alimentos – com a agravante que os ovos são imediatamente infectantes para os hospedeiros intermediários e para o Homem (Eckert et al., 2001, Deplazes et al., 2011). Existem insectos coprófagos e outros animais que podem servir de vector mecânico dos ovos (McManus et al., 2003).

Porque tem uma cobertura pegajosa (CFSPH, 2011), os ovos podem também aderir às solas dos sapatos ou às extremidades dos animais, podendo ser disseminados ainda pela chuva, vento, fômites ou aves (Moro & Schantz, 2009, Deplazes et al., 2011). O Homem pode ser infectado através do contacto próximo com o cão ou outros carnívoros hospedeiros, uma vez que os ovos se podem espalhar por todo o pêlo do animal. Um simples gesto de passar a mão pelo pêlo do cão (ou ser lambido por este) pode fazer com que os ovos adiram às mãos, e se estas não forem lavadas, ao serem conduzidas à boca, pode-se ingerir os ovos (Eckert et al., 2001). Apesar da via de infecção oral ser a mais frequente, há evidências de que os ovos possam acidentalmente contaminar pequenas feridas cutâneas e aí desenvolver formas larvares (Deplazes et al., 2011). Depois de um hospedeiro intermediário ingerir os ovos viáveis, a camada de queratina protectora do ovo é destruída pelas enzimas proteolíticas dos sucos gástricos libertando a oncosfera. A oncosfera apresenta três pares de ganchos que servem para perfurar a lâmina própria do intestino, chegando via sanguínea ou linfática ao órgão onde se irá desenvolver e perder os ganchos até chegar à forma larvar (Eckert et al., 2001). A larva de *Echinococcus granulosus* ou metacestode é o quisto hidático, cujo crescimento no hospedeiro é lento (seis a doze meses) (Taylor et al., 2007). O quisto hidático que se forma nos hospedeiros intermediários aparece mais frequentemente no fígado e nos pulmões do que noutros órgãos (Rojo-Vazquez et al., 2003), o que se deverá ao facto destes órgãos possuírem os primeiros grandes vasos sanguíneos que são os mais utilizados para a migração da oncosfera (Eckert & Deplazes, 2004). Da membrana germinativa destes quistos podem gerar-se por reprodução assexuada vesículas filhas (Zhang et al., 2003). O ciclo de vida fica completo quando os órgãos que contêm estes quistos são ingeridos pelo hospedeiro definitivo, os carnívoros (Torgerson & Deplazes, 2009). Por cada quisto hidático ingerido pelo hospedeiro definitivo, muitos parasitas adultos podem desenvolver-se no intestino, dependendo do número de vesículas filhas férteis desse quisto (cada uma dará origem a um novo parasita adulto) (Ballweber, 2001). Quando os carnívoros ingerem quistos com protoescólices viáveis, estes evaginam no intestino e aderem à mucosa intestinal, tornando-se adultos. A maturidade sexual é alcançada às quatro a cinco semanas (McManus et al., 2003). Na Figura 1.5 apresenta-se um esquema completo do ciclo de vida deste parasita.

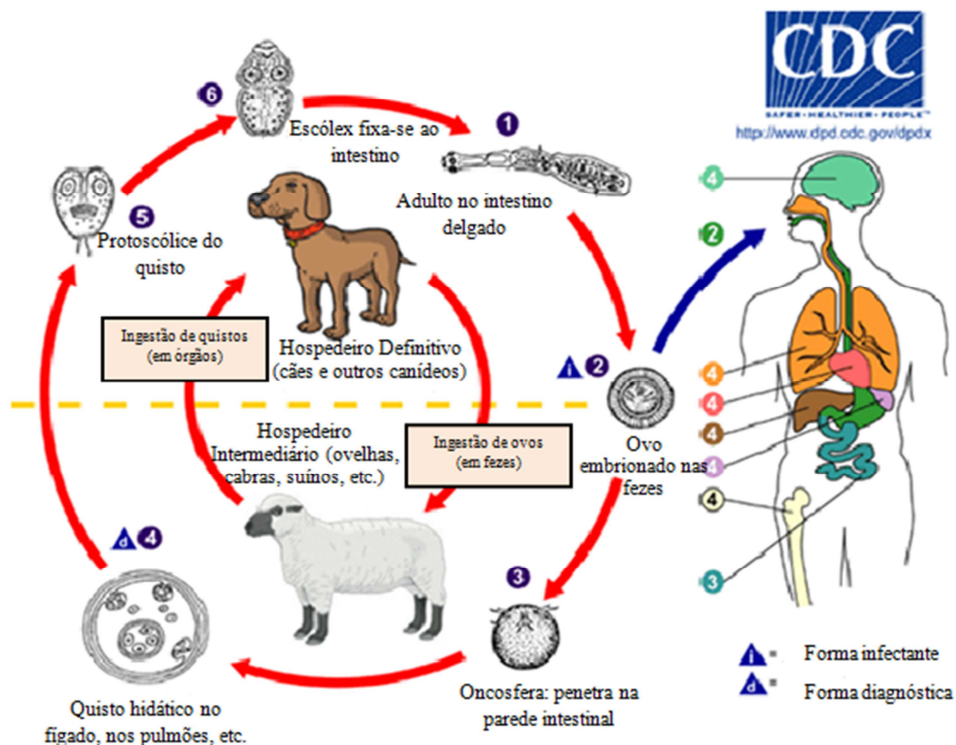


Figura 1.5 - Ciclo de vida do parasita *Echinococcus granulosus* (Adaptado de: <http://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/>).

O ciclo de vida deste parasita inclui assim uma fase de reprodução sexuada (parasita adulto) e uma outra assexuada (metacestode ou quisto hidático) (Thompson & Jenkins, 2014).

2. Epidemiologia

2.1. Hospedeiros

Echinococcus tem não só um ciclo doméstico (cão-ungulado doméstico) mas também um silvestre (lobo-ungulado silvestre). Contudo, estes ciclos podem-se cruzar, através do consumo de peças de caça por cães domésticos, e de espécies pecuárias por lobos ou outros carnívoros silvestres (Eckert & Thompson, 1997, Sobrino et al., 2006). Os animais silvestres podem ter grande importância enquanto reservatórios e perpetuadores da transmissão da doença, sendo fonte de infecção quer para animais domésticos quer para o Homem (Jenkins et al., 2005).

Os hospedeiros definitivos são carnívoros domésticos (especialmente o cão) ou silvestres (como o lobo, o chacal, o dingo ou a raposa, entre muitos outros)

(Zhang et al., 2003, McManus, 2013). Os lobos são um hospedeiro bastante importante no Canadá (Jenkins et al., 2011), e na Finlândia, onde a prevalência deste parasita pode chegar a 30% nesta espécie (Hirvela-Koski et al., 2003). As hienas e os felinos também são referidos como possíveis hospedeiros definitivos (CFSPH, 2011). Os cães e os gatos podem ser simultaneamente hospedeiros intermediários aberrantes (Torgerson & Deplazes, 2009), tendo sido recentemente descrito um caso de hidatidose peritoneal num felino doméstico em co-infecção com o vírus da imunodeficiência felina (Armua-Fernandez et al., 2014).

Os hospedeiros intermediários são mamíferos, sobretudo ungulados (ovinos, caprinos, suínos, bovinos, equinos e camelídeos) domésticos e silvestres. Há referências a casos de hidatidose em hipopótamos, girafas, cangurus e outros marsupiais, impalas e muitos outros animais silvestres (Barnes et al., 2008, Huettner & Romig, 2009). Como o ciclo de vida depende de carnívoros ingerirem vísceras de herbívoros, o Homem funciona como hospedeiro “fundo-de-saco”, contudo nem sempre assim acontece (McManus et al., 2003, Mandal & Mandal, 2012). Existem populações humanas transumantes em regiões hiperendémicas em África que não enterram os seus cadáveres, ficando estes disponíveis para os carnívoros domésticos e silvestres (Macpherson, 1983). Os caçadores, os comerciantes de peles, veterinários e biólogos de animais selvagens correm um risco maior de se infectarem com este agente (CFSPH, 2011).

2.2. A doença no mundo

Estima-se que um milhão ou mais de indivíduos no mundo, sofram actualmente de hidatidose, e que a carga de doença global seja semelhante a outras doenças negligenciadas mais bem conhecidas (Torgerson & Macpherson, 2011).

Esta zoonose tem uma distribuição mundial, estando presente em todos os continentes (Eckert et al., 2000): há várias zonas endémicas na América do Sul (Arambulo, 1997, Pierangeli et al., 2007), na América do Norte (Moro & Schantz, 2006, Jenkins et al., 2011) e na Austrália (Eckert et al., 2001, Grosso et al., 2012), é uma doença emergente na Ásia Central (Torgerson et al., 2003, Jenkins et al., 2005), é considerada a zoonose parasitária mais importante no Médio Oriente e

em África (Dar & Alkarmi, 1997, Azlaf & Dakkak, 2006, Magambo et al., 2006, Sadjadi, 2006), e é urgente o seu controlo na Índia (Singh et al., 2014). Estima-se que a China tenha cerca de 40% dos casos de hidatidose a nível mundial (Budke et al., 2006). E na África subsariana, no Norte do Quênia, há uma região onde a incidência é das mais elevadas do mundo (Magambo et al., 2006). Tal facto poderá estar relacionado com o hábito local de consumo de intestinos de cães (CFSPH, 2011).

Em algumas ilhas (Gronelândia, Islândia, Nova Zelândia e Tasmânia, por exemplo) a hidatidose terá sido erradicada graças a programas de controlo desenvolvidos, mas em zonas continentais essa erradicação tem-se mostrado mais difícil (Eckert et al., 2001, Torgerson & Macpherson, 2011), nomeadamente devido ao potencial de re-introdução através dos países vizinhos e dos animais silvestres (Torgerson & Budke, 2003).

2.3. A doença na Europa

Na Europa, apenas a Irlanda, Islândia e Dinamarca, Noruega, Suécia, Estónia e Letónia serão livres de estirpes zoonóticas de *Echinococcus granulosus* (Torgerson & Budke, 2003, Carmena & Cardona, 2013). Moro & Schantz (2009) afirmam que a infecção reemergiu em zonas onde se julgava controlada – como na Bulgária (Todorov & Boeva, 1999), no país de Gales (Buishi et al., 2005) e na ex-União Soviética (Torgerson et al., 2003).

Neste continente a região mais afectada é a do Mediterrâneo (Mwambete et al., 2004, Jenkins et al., 2005, Garippa, 2006, Varcasia et al., 2006, Varcasia et al., 2007, Carmena et al., 2008, Rinaldi et al., 2008), considerada hiperendémica (McManus et al., 2003), e é a zoonose parasitária mais importante da região (Seimenis, 2003). Na Grécia são referidas prevalências de cerca de 31% em ovinos (Sotiraki et al., 2003). Jimenez et al. (2002) identificam prevalências de 20,3% em ovinos na região de La Rioja no Norte de Espanha, que corresponderiam a uma diminuição da prevalência de 75,4%, comparando com a década de 90. Contudo, num estudo realizado na província de Salamanca, conclui-se que a hidatidose é considerada uma doença reemergente, com uma incidência real em humanos superior ao previamente estimada (Pardo et al., 2005). Tal ideia é também defendida por Seimenis (2003). Em algumas regiões de Espanha, as taxas de

incidência de hidatidose humana são de 1,1 a 3,4 casos por 10⁵ habitantes, e coexistem com prevalências de hidatidose ovina e bovina de 23% (Carmena et al., 2008). Os dados mais recentes disponíveis da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, *European Food Safety Authority*), relativos a 2011, referem um número total de 781 casos confirmados de equinococose na União Europeia (UE), tendo sido 530 (85.1%) destes causados por *Echinococcus granulosus*. Evidenciam ainda um aumento de 3.3% de casos comparando com 2010, mas que se deve mais a *Echinococcus multilocularis* (EFSA, 2013). Na Tabela 1.2 apresentam-se os dados europeus mais recentes relativos ao número de novos casos de doença na UE em humanos.

Tabela 1.2 – Incidência da doença na UE entre 2007-2011 (EFSA, 2013)

País	2011		2010	2009	2008	2007
	Casos confirmados	Casos confirmados/ 100000	Casos confirmados			
Áustria	7	0.08	21	20	6	16
Bélgica	1	0.01	1	0	0	1
Bulgária	307	4.09	291	323	386	461
Chipre	2	0.25	0	1	1	4
República Checa	0	0	5	1	2	3
Dinamarca	-	-	-	-	-	-
Estónia	0	0	0	1	1	2
Finlândia	1	0.02	1	1	1	1
França	45	0.07	33	27	14	25
Alemanha	142	0.17	117	106	102	89
Grécia	17	0.15	11	22	28	10
Hungria	11	0.11	9	8	7	8
Irlanda	0	0	1	1	2	0
Itália	-	-	-	-	-	-
Letónia	10	0.45	14	15	21	12
Lituânia	24	0.74	23	36	32	12

Tabela 1.2 (cont.) – Incidência da doença na UE entre 2007-2011 (EFSA, 2013)

País	2011		2010	2009	2008	2007
	Casos confirmados	Casos confirmados/ 100000	Casos confirmados			
Luxemburgo	1	0.20	1	0	0	0
Malta	0	0	0	0	0	0
Holanda	49	0.29	-	25	12	12
Polónia	19	0.05	34	25	28	40
Portugal	1	0.01	3	4	4	10
Roménia	53	0.25	55	42	119	99
Eslováquia	2	0.04	9	4	5	4
Eslovénia	8	0.39	8	9	7	1
Espanha	53	0.11	82	86	109	131
Suécia	19	0.20	30	12	13	24
Reino Unido	9	0.01	7	7	9	7
UE Total	781	0.18	756	775	909	972

2.4. A doença em Portugal

Em 1897 já Moraes e Costa, escrevia na sua Dissertação apresentada à Escola Médico-Cirúrgica do Porto, que *“a pathologia dos kistos hydatricos do fígado, não é d'hoje. Já Hippocrates notava que o fígado era susceptível de se encher dum liquido, que se esvasiava, algumas vezes, no peritoneo, produzindo accidentes de tal gravidade que tinham a epiloga-los a morte”*. Em Portugal, pelo menos na cidade do Porto nesta época, a hidatidose humana seria um problema sério se considerarmos as várias dissertações médicas sobre este tema disponíveis até on-line (Moraes e Costa, 1897, Pacheco, 1889, Rangel, 1900, Areosa, 1924).

Mais recentemente, Portugal encontrava-se entre os países considerados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como endémico com uma incidência nacional estimada em 2,2 casos/100000 habitantes (Eckert et al., 2001). David de Moraes (2007) mostrou no seu estudo que o distrito de Évora é hiperendémico, tendo o concelho do Alandroal uma das mais elevadas incidências mundiais de hidatidose: 50,1 casos/100000 habitantes/ano. A classificação de zona hiperendémica é atribuída quando se verifica uma incidência de pelo menos 10

casos/100000 habitantes por ano. Contudo, o mesmo autor defende que em virtude da extinção da transumância, de notórias mudanças socioeconómicas ocorridas no meio rural e da “modernização” do manejo do gado, a parasitose terá entrado em declínio (David de Moraes, 2007), sendo o país agora sine-endémico. No quinquénio das estatísticas oficiais portuguesas de 2004-2008, a incidência terá sido de 0,1 casos/100000 habitantes/ano (David de Moraes, 2013). Apesar de a incidência estar em declínio, importa lembrar que a estirpe que prevalece em Portugal é a mais patogénica (G1), pelo que continuam a verificar-se formas muito graves de hidatidose (David de Moraes, 2007).

A hidatidose, é considerada uma doença de declaração obrigatória (DDO) para a Organização Internacional das Epizootias (OIE) (OIE, 2014), assim como para a Direcção Geral de Saúde (DGS) (DGS, 2007) e Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) (DGAV, 2014) em Portugal. Em 2007 terão sido notificados 834 casos humanos de hidatidose na União Europeia, e destes 10 terão sido em Portugal (EFSA, 2009). Num relatório semelhante mas das DDO da DGS, em Portugal foram notificados 53 casos humanos no quinquénio de 2002-2006. Contudo, David de Moraes (2007) refere no seu estudo, que foram diagnosticados uma média de 122 casos humanos por quinquénio, apenas no distrito de Évora, o que nos leva a considerar a possibilidade de haver uma subnotificação dos casos confirmados. David de Moraes (2010) refere que os dados oficiais são manifestamente insatisfatórios.

Mais recentemente, um artigo publicado no boletim epidemiológico do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSARJ) (Reis et al., 2014) vem reforçar esta ideia. O estudo refere que entre Janeiro de 2008 e Dezembro de 2013 foram diagnosticados, apenas pelo INSARJ, 130 novos casos de doença, sendo estes residentes nos distritos de Évora (46/130; 35,4%) e de Lisboa (46/130; 35,4%), seguidos do distrito de Faro (18/130; 13,8%). De acordo com a última edição do relatório da DGS, intitulado “Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012”, foram notificados em Portugal apenas 11 casos nesse período (Pinto et al., 2014). O número de casos de hidatidose notificados entre os anos de 1987 e 2012 apresentam-se na Figura 1.6.

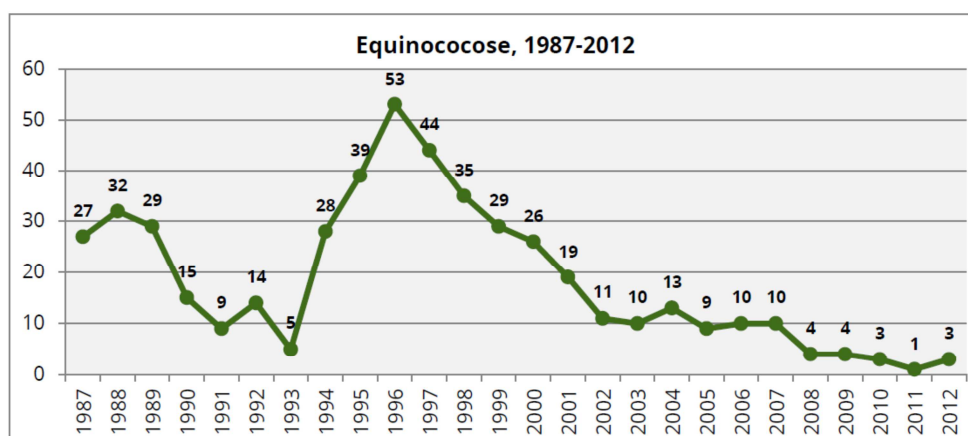


Figura 1.6 - Número de casos humanos de hidatidose em Portugal entre 1987 e 2012 (Fonte: Pinto et al., 2014).

Em Portugal, a incidência da hidatidose humana aumenta de norte para sul, com o Alentejo a deter os mais importantes valores, mas a hidatidose animal segue no sentido inverso, aumentando de sul para norte (David de Moraes, 2011), o que poderá ser explicado pelos diferentes genótipos e grau de patogenicidade de *Echinococcus granulosus*. No que diz respeito à doença no Homem, esta será mais prevalente no sexo feminino (David de Moraes, 2007, 2013, Reis et al., 2014), sendo o grupo etário mais afectado o correspondente à sexta (David de Moraes, 2007, 2013) ou sétima década de vida (Reis et al., 2014). Tal facto poderá ter explicação não só no longo período de incubação da doença, como no relativamente recente acesso aos meios de diagnóstico imagiológico tão úteis para a identificação desta doença (David de Moraes, 2007). Acresce ainda que este poderá ser um sinal de que o contágio não se mantém activo (David de Moraes, 2010, 2013). Contudo Reis et al. (2014) reportam cinco casos em crianças com idade inferior a 11 anos nos últimos seis anos em Portugal.

No Norte, o distrito de Vila Real tem sido aquele onde se têm registado mais casos humanos. Em Vinhais, concelho pertencente ao distrito de Bragança, em 2006 foi feito um estudo exaustivo da doença, quer em humanos, quer em animais. No levantamento efectuado, detectou-se a presença de quistos hidáticos em suínos (8,1%, $N=333$) e em pequenos ruminantes (30%, $N=1300$). Foram recolhidas amostras fecais indirectas de cães, e foram identificados ovos de *Taenia* spp. (14,2%, $N=330$), sendo que em 7% das amostras o parasita era *Echinococcus granulosus*. Foram ainda feitas recolhas serológicas a pastores de ovinos e a criadores de suínos e houve reconhecimento de antígenos específicos

de *Echinococcus granulosus* de genótipo G1 (12,6%, N=103) (Castro et al., 2006). No que diz respeito a animais silvestres, Vieira-Pinto et al. (2011) identificaram quistos hidáticos em javalis e Guerra et al. (2013) *Echinococcus granulosus* em lobos ibéricos, ambos no Norte.

No concelho de Cantanhede, distrito de Coimbra, pela existência de casos notificados em humanos e pela tradição e valor económico que representa o porco na Bairrada através do consumo do leitão, foi realizado um estudo de caso em 2004. Acompanharam-se 66 abates em contexto familiar, para autoconsumo, tendo 10,6% dos suínos apresentado quisto hidático macroscópico, principalmente no fígado (Conceição et al., 2005). Em 2007, no concelho de Miranda do Corvo, também pertencente ao distrito de Coimbra, foi realizado um trabalho tendo como objecto de estudo principal o cão, onde se encontrou uma prevalência de 3% de *Taenia* spp. (Conceição et al., 2007).

3. Patologia

Nos hospedeiros definitivos, estes parasitas penetram profundamente entre as vilosidades nas criptas de *Lieberkuhn* (Torgerson & Budke, 2003), mas aparentemente, não causam sintomas relevantes, mesmo quando as infecções são severas, havendo evidências de que estes poderão desenvolver algum tipo de resistência à infecção intestinal por *Echinococcus* (Deplazes et al., 2011).

Contudo a hidatidose é uma importante infecção para os hospedeiros intermediários, provocando significativas perdas económicas na produção animal, por reprovação de órgãos em matadouro e de perdas de produtividade (Jimenez et al., 2002, Budke et al., 2006, Sariozkan & Yalcin, 2009, Benner et al., 2010). Nas espécies pecuárias as perdas incluem: redução da produção e qualidade da carne, leite e lã, redução da fertilidade, diminuição do peso vivo, reprovação de órgãos em matadouro e custos com a destruição de vísceras infectadas e animais mortos (Battelli, 2009). A doença no Homem, além de causar notável morbidade e mortalidade (Eddi et al., 2004, Jenkins et al., 2005, Budke et al., 2006, Craig et al., 2007), também apresenta custos directos e indirectos não desprezíveis (Carabin et al., 2014).

No Homem, assim como nos hospedeiros intermediários, o desenvolvimento das formas larvares dá origem à formação de quistos hidáticos, podendo ser assintomáticos durante anos, surgindo os sinais clínicos tardiamente como resultado da disfunção dos órgãos afectados, ou mesmo nunca surgindo (McManus et al., 2003, Eddi, et al., 2004, Moro & Schantz, 2009). O período de incubação da doença não é claro, podendo variar entre meses a anos (McManus et al., 2003). Segundo Craig et al. (2007) o tempo médio entre a infecção e o diagnóstico é de cerca de cinco a dez anos. Dependendo dos órgãos afectados, a sintomatologia pode ser muito variável (McManus et al., 2003). Os quistos localizados no cérebro e olho podem causar sintomatologia mesmo quando são pequenos, daí que a maior parte dos casos de hidatidose intracerebral sejam diagnosticados em crianças (Moro & Schantz, 2009). Apesar de mais de 90% dos quistos ocorrerem no fígado e pulmão (McManus et al., 2003), crescem os relatos de diagnóstico de quistos em outras localizações anatómicas (Altas et al., 2010, Butcovan et al., 2010, Caglayan et al., 2010, Demir et al., 2010, Demircan et al., 2010, Ekiz et al., 2010, Eryilmaz et al., 2010, Kanagal and Hanumanalu, 2010, Kumar et al., 2010b, Kumar et al., 2010a, Moretti et al., 2010, Notarnicola et al., 2010, Ozcan et al., 2010, Shamim, 2010, Shukla et al., 2010, Ansari et al., 2014). A localização hepática é referida como a mais prevalente nos estudos realizados em Portugal (David de Moraes, 2007, Reis et al., 2014), o que também estará relacionado com a idade dos pacientes, uma vez que nos grupos etários mais jovens predominam quistos hidáticos com localização pulmonar, enquanto que nos adultos predomina a localização hepática (David de Moraes, 2010). Os quistos de localização pulmonar podem produzir quadros alérgicos e tosse com eliminação de expectoração sanguinolenta. Muitas vezes infecções secundárias levam à formação de um abscesso pulmonar crónico. Quando a localização do quisto é hepática, os sinais clínicos que frequentemente se apresentam são dor abdominal, febre, náuseas, ascite, vômitos e diarreia. A hidatidose óssea produz dor focal (dor nas costas, dor ciática, fracturas, paresias ou paraplegias) e tem normalmente, mau prognóstico (Eckert & Deplazes, 2004). Se os quistos rupturam a libertação súbita do seu conteúdo precipita uma reacção alérgica anafiláctica que pode ser fatal (Moro & Schantz, 2009). A ruptura de um quisto, não sendo fatal, dispersa fragmentos por toda a cavidade pleural ou peritoneal, provocando assim hidatidose múltipla (Ballweber, 2001). Trata-se de uma patologia de desenvolvimento crónico, uma vez que os quistos podem levar meses a anos para se desenvolverem. Os quistos variam de tamanho (podem

atingir 20 cm de diâmetro e conter um volume de vários litros), forma, e podem estar presentes em grande número em um único órgão (Eckert & Deplazes, 2004, Moro & Schantz, 2009). No que diz respeito ao crescimento dos quistos, o seu diâmetro pode aumentar até cinco cm por ano, mas também pode persistir vários anos sem qualquer crescimento (CFSPH, 2011).

Uma estimativa preliminar da carga de doença global anual sugeriu que a carga é de aproximadamente um milhão de anos de vida ajustados por incapacidade - DALYs (*disability-adjusted life year*) (Budke et al., 2006). Assim, além de económico, o impacto desta doença na qualidade de vida de quem sofre dela é notório, havendo evidências recentes de que estes pacientes nunca recuperam completamente. O impacto económico da hidatidose foi revisto num estudo publicado em 2003 (Torgerson, 2003).

4. Diagnóstico

4.1. No hospedeiro definitivo

A pesquisa de *Echinococcus granulosus* no hospedeiro definitivo é um ponto-chave no desenvolvimento de estudos epidemiológicos (Eckert et al., 2001).

Para o diagnóstico da doença no hospedeiro definitivo podem ser usadas técnicas de diagnóstico efectuadas *ante-* e *post-mortem*, apresentando cada uma delas vantagens e desvantagens (Carmena & Cardona, 2013). A necrópsia atenta e cuidadosa é considerada a técnica *gold standard* (Torgerson & Deplazes, 2009), mas este método é laborioso e por vezes eticamente questionável, não sendo adequado para trabalhos de larga escala (Eckert et al., 2001). O intestino é aberto, colocado em solução salina e a mucosa intestinal raspada para pesquisa de parasitas adultos (Torgerson & Deplazes, 2009), sendo que estes parasitas são mais facilmente encontrados no primeiro terço do intestino (CFSPH, 2011). Este método terá uma sensibilidade de cerca de 78% (Eckert, 2003). Se durante a necrópsia for usada a técnica de sedimentação, que examina todo o conteúdo intestinal do animal e consegue detectar até um único parasita (Carmena & Cardona, 2014), estima-se que a sensibilidade alcance os 96-100% (Barnes et al., 2012). Mais recentemente, foi desenvolvida uma modificação nesta técnica acrescentando um passo de filtração que aumenta a eficiência no processamento

de amostras (redução do tempo necessário por amostra) (Gesby et al., 2013). A manipulação destas amostras biológicas deve ter em conta todos cuidados de biossegurança necessários, sendo recomendável que os intestinos sejam colocados durante pelo menos dois dias a -80°C, de forma a inactivar possíveis ovos de *Echinococcus* presentes (Carmena & Cardona, 2014).

As técnicas realizadas com o animal vivo são mais seguras para os investigadores e menos consumidoras de tempo, embora geralmente caras e laboriosas (Carmena & Cardona, 2014).

No passado foi usada a purgação com o bromidrato de arecolina, sendo uma técnica que alcança quase 100% de especificidade (Carmena & Cardona, 2013), contudo a sua sensibilidade é baixa, 39%. O uso desta técnica implica muitos cuidados relativos a biossegurança (Ziadinov et al., 2008), além de aumentar a contaminação ambiental (Guarnera et al., 2000), e alguns animais revelarem efeitos secundários indesejáveis (Barnes et al., 2012). Contudo, esta técnica, juntamente com a necrópsia, permitem aquilatar sobre a carga da doença, um dado epidemiológico bastante importante (Carmena & Cardona, 2013).

Também se pode recorrer aos métodos coprológicos clássicos para detecção de ovos, nomeadamente os métodos de flutuação fecal. No entanto, para além destes ovos serem morfologicamente indistinguíveis de outros de *Taenia* spp. (Foreyt, 2001, Carmena & Cardona, 2013), estes métodos apresentam uma baixa sensibilidade (Deplazes et al., 2011). No hospedeiro definitivo, as técnicas para identificação do parasita incluem ainda a detecção com copro-antigénios, contudo ocorrem muitas reacções cruzadas com *Taenia* spp. ou outros helmintes (Torgerson & Deplazes, 2009). A sensibilidade da detecção por copro-antigénios é geralmente boa apenas em infecções moderadas a elevadas, sendo este método também útil em infecções em período pré-patente (Deplazes et al., 2011). Tem ainda a vantagem de permitir a pesquisa *ante-* e *post-mortem*, graças à estabilidade dos copro-antigénios, nomeadamente em amostras ambientais (Carmena & Cardona, 2013). Em infecções leves, o número de parasitas não será o suficiente para estimular uma resposta imunológica do hospedeiro (Torgerson, 2006a). Existem ainda técnicas de biologia molecular, nomeadamente de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), para uso directo em amostras fecais ou para identificação de ovos isolados (Carmena & Cardona, 2013). A técnica de PCR é laboriosa e cara (Deplazes et al., 2011), logo não é útil para estudos de larga

escala (Torgerson & Budke, 2003). É necessário processar uma grande quantidade de fezes para contrariar os problemas de sensibilidade, e também pela inibição provocada por alguns componentes das fezes, que igualmente diminuem a sensibilidade destes métodos (Mathis & Deplazes, 2006). Ziadinov et al. (2008) sugerem a combinação do isolamento de ovos seguido de PCR para aumentar a sensibilidade para 78%. Novos métodos mais expeditos e económicos tenderão a ser desenvolvidos, como um recentemente apresentado que combina uma lise química com a proteinase K seguido de PCR (Petrigh & Fugassa, 2013).

4.2. No Homem

O diagnóstico clínico humano não é fácil, pelo que geralmente resulta da conjugação de factores epidemiológicos, história clínica do doente e sintomas. David de Moraes (2006) defende por isso uma abordagem integrada holística do paciente. Apesar de ser uma helmintíase, a hidatidose não provoca eosinofilia (Rinaldi et al., 2014). O diagnóstico em humanos é altamente dependente das técnicas imagiológicas (Craig et al., 2007, Torgerson & Deplazes, 2009). O rastreio imagiológico duma população pode servir, além de meio de diagnóstico, como uma interessante e eficaz forma de realizar educação para a saúde dessa população, se aos exames se juntarem algumas actividades de informação e formação como já aconteceu em alguns estudos (Apt et al., 2000, Kachani et al., 2003). O uso de mais do que um método de diagnóstico pode fazer superar a falta de um método perfeito (Eckert & Deplazes, 2004, Torgerson & Deplazes, 2009). Quando os pulmões estão afectados, podem-se encontrar protoescólices em lavagens brônquicas (CFSPH, 2011).

O diagnóstico imunológico é útil não só para o diagnóstico propriamente dito, como para o *follow-up* dos pacientes após o tratamento cirúrgico ou farmacológico. Os métodos de serodiagnóstico podem confirmar a suspeita clínica, e também colaborar em estudos epidemiológicos em regiões endémicas, contudo, os métodos disponíveis apresentam grandes variações no que diz respeito à sensibilidade e especificidade. Assim, alguns métodos (testes intradérmico de *Cassoni*, de fixação de complemento, de hemaglutinação indirecta, de aglutinação em latex, entre outros) foram substituídos por testes de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) entre outros (Zhang et al., 2003). O diagnóstico por ELISA, usando líquido hidático, tem alta sensibilidade (95%) mas a

sua especificidade é insatisfatória. Quando se usam outras técnicas (como o *immunoblotting* e a imunoeletroforese) a especificidade aumenta, mas em contrapartida perde-se sensibilidade. A detecção serológica de antígenos de *Echinococcus granulosus* tem uma sensibilidade menor do que a detecção de anticorpos (McManus et al., 2003, Zhang & McManus, 2006). Moro & Schantz (2009) referem que os quistos hepáticos são mais eficientes a gerar resposta imunitária que os pulmonares, em concordância com Eckert & Deplazes (2004) que referem que aproximadamente 10 a 20% dos pacientes com quistos hepáticos e cerca de 40% dos que tem quistos pulmonares, não produzem níveis de anticorpos detectáveis pelas técnicas clássicas de detecção de anticorpos, resultando em falsos negativos. Rinaldi et al. (2014) defendem mesmo que se a localização dos quistos for extra hepática e pulmonar, os resultados serão também falsos negativos. As lipoproteínas antígeno B e antígeno 5, os componentes mais relevantes do líquido hidático, são as mais usadas como antígenos em imunodiagnósticos por *immunoblotting* e/ou imunoprecipitação de antígenos radiomarcados (Zhang & McManus, 2006). Castro et al. (2006) obtiveram bons resultados usando *immunoblotting*, tendo sido essa técnica introduzida na rotina de diagnóstico da hidatidose humana no INSARJ. Um estudo com 630 crianças, refere percentagens de seropositividade (8,95% e 10,1%) muito superiores às conseguidas por ecografia (0,3%), o que demonstra a discrepância que pode haver utilizando diferentes métodos de diagnóstico (Ozkol et al., 2005).

A caracterização genética de *Echinococcus granulosus* teve um papel importante na compreensão da epidemiologia da doença, assim como no seu controlo e prevenção (Schneider et al., 2008). Nenhum caso foi reportado de um paciente que tivesse parasitado com mais do que um genótipo (Rojas et al., 2014).

4.3. No hospedeiro intermediário

O diagnóstico de *Echinococcus granulosus* em animais de interesse pecuário, raramente é indicado a nível individual, mas estudos populacionais são importantes para obter informação epidemiológica, sobretudo para a construção dos programas de controlo da doença (Torgerson & Heath, 2003).

Nos hospedeiros intermediários também a necrópsia é considerada a técnica *gold standard* (Torgerson & Deplazes, 2009; Cardona & Carmena, 2013).

Contudo, para efeitos de estudos epidemiológicos, quando consideramos os animais abatidos em matadouro para consumo devemos ter presente que à partida são enviados para o matadouro animais saudáveis e passíveis de serem economicamente mais rentáveis e em melhor condição corporal, logo, estes não representam uma amostra representativa da população (Barnes et al., 2012). No que diz respeito particularmente aos ovinos, os abatidos geralmente são jovens, e inevitavelmente terão uma prevalência mais baixa do que os mais velhos (Bardonnet et al., 2003, Torgerson & Heath, 2003), uma vez que a prevalência da hidatidose aumenta com a idade (Lahmar et al., 2013). O baixo valor comercial da carne de ovinos adultos tem como consequência o abate doméstico de um elevado número de animais, em vez de num matadouro (Scala & Mazzette, 2009). Assim, a prevalência da hidatidose quando avaliada em matadouro pode ser subestimada (Torgerson & Deplazes, 2009). Alguns estudos estimaram a prevalência de hidatidose em rebanhos inteiros por ecografia, numa tentativa de superar os resultados enviesados associados aos estudos de matadouro (Njoroge et al., 2000). O exame ecográfico pode ser usado mas apenas para quistos hepáticos (Torgerson & Deplazes, 2009).

Comparando com os humanos, tem sido feita pouca investigação direccionada para o desenvolvimento de técnicas de imunodiagnóstico em animais domésticos (McManus et al., 2003, Zhang et al., 2003). A pesquisa de anticorpos pode ser usada para a detecção da infecção a nível do rebanho (Torgerson & Budke, 2003), contudo o diagnóstico imunológico nos ovinos apresenta problemas de sensibilidade e especificidade, limitando o seu uso – testes de hemaglutinação indirecta e ELISA tem sido executados com pouco sucesso. A baixa sensibilidade tem sido geralmente atribuída às reacções cruzadas com outros parasitas do género *Taenia* (Gatti et al., 2007). Além disso, a resposta imunológica dos animais produz muito poucos anticorpos quando comparada com os humanos (Zhang et al., 2003).

Os métodos moleculares, baseando-se na análise de DNA, examinam o genoma do parasita directamente, sendo altamente sensíveis (Bowles & McManus, 1993a). As espécies de *Echinococcus* podem ser distinguidas por PCR seguido de sequenciação do DNA, usando sequências mitocondriais, sendo que os genes em que é mais aplicada são o citocromo c oxidase sub-unidade 1 (COI) e o NADH desidrogenase sub-unidade 1 (ND1) (McManus & Thompson, 2003). Também

pode ser feita uma análise de polimorfismos usando enzimas de restrição (*Restriction fragment length polymorphism* - RFLP) (Eckert et al., 2001). Usando “primers” para zonas bastante conservadas destes genes consegue-se comparar a zona amplificada com outras sequências anteriormente publicadas dos diferentes genótipos de *Echinococcus granulosus*, e, assim, determinar o genótipo das amostras pretendidas (Bowles & McManus, 1993, Eckert et al., 2001). Outra possibilidade passa pela amplificação da região *internal transcribed spacer 1* (ITS1) sendo depois submetida à digestão por enzimas de restrição (Bowles & McManus, 1993).

5. Tratamento

A hidatidose no Homem é difícil de tratar e aquando do tratamento, não raras vezes ocorrem complicações graves (Ouerghi et al., 2010).

Para o tratamento do Homem existem quatro abordagens possíveis: cirurgia, a técnica conhecida como PAIR, do inglês *Puncture-Aspiration-Injection-Reaspiration*, tratamento farmacológico e ainda o *watch and wait*. A opção pelos diferentes tipos de tratamento depende da dimensão, localização, idade do quisto assim como de possíveis co-morbilidades (Rinaldi et al., 2014). A cirurgia, com todos os riscos, continua a ser a resolução mais eficaz (Brunetti et al., 2010). Contudo, a terapêutica cirúrgica poderá ser impraticável em pacientes com quistos múltiplos e em diversos órgãos, ou em localizações anatómicas complexas. Uma intervenção cirúrgica mais radical está associada a maiores complicações mas também a uma menor probabilidade de recidiva (McManus et al., 2003, Moro & Schantz, 2009). Há estudos que referem uma taxa de recorrência entre 2% e 25% (Ammann & Eckert, 1996).

Existe ainda o tratamento médico quimioterápico com benzimidazóis (Torgerson & Budke, 2003), contudo 20 a 40% dos casos não respondem favoravelmente (Moro & Schantz, 2009).

6. Prevenção

Apesar da hidatidose humana ser uma infecção severa e frequentemente fatal, a sua importância não é reconhecida pelas autoridades de saúde de muitos países (Eckert & Deplazes, 1999). A prevenção e o controlo de zoonoses parasitárias emergentes requerem uma completa compreensão da epidemiologia destas infecções e dos factores de emergência (Chomel, 2003). Contudo, a atitude da comunidade em relação às zoonoses tem um papel fundamental no sucesso da implementação de medidas de prevenção e controlo das doenças (Macpherson, 2005). Assim, o planeamento de tais medidas, é uma questão tão socio-política como biológica ou parasitária. Um dos motivos que contribui para que esta doença seja negligenciada é o facto de que os políticos estarão mais preocupados com outras doenças que tem maior impacto para os media (como por exemplo as encefalopatias espongiformes ou mais recentemente, a doença da língua azul). Além disso, para erradicar esta doença são precisos planos a longo prazo, o que contrasta com a necessidade dos políticos em obterem resultados a curto prazo (Scala & Mantecze, 2009). Efectivamente, poucos foram os países capazes de reduzir substancialmente ou erradicar esta doença (McManus et al., 2003, Craig et al., 2007). Seimenis (2003), um perito da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, nomeia algumas causas para a falha na prevenção: a escassez de dados sobre a prevalência desta doença quer em animais, quer em humanos; a não existência de trabalho e comunicação inter-sectorial entre os técnicos de saúde pública humana e animal; a falta de conhecimento da população e até dos grupos de risco, pelo não investimento em planos de educação para a saúde na prevenção das zoonoses.

6.1. Promover a investigação epidemiológica e imunológica da doença

A escassez de dados sobre a prevalência de doenças zoonóticas (quer em animais quer em humanos) é um problema global, mas claramente identificado por Seimenis (2003) para a região do Mediterrâneo e para a hidatidose em particular. Esta falha na epidemio-vigilância da doença conduz inevitavelmente a falhas na prevenção (Deplazes et al., 2011). A recolha de dados da doença à escala regional é importante para planificar as estratégias de controlo

(Fontanarrosa et al., 2006). Por exemplo, no estudo realizado por Jiménez et al. (2002) os dados epidemiológicos recolhidos permitiram concluir que os maiores reservatórios de *Echinococcus granulosus* eram os cães errantes, precisamente aqueles que não são desparasitados, pelo que o plano de controlo da doença passou a incluir um maior cuidado no controlo de cães errantes. Acrescentam estes e outros autores (Carmena et al., 2008) que, além de recolhidos, os dados epidemiológicos devem ser comunicados.

A recolha de dados sobre a ocorrência da doença em matadouro é uma das componentes na epidemio-vigilância da doença (Moro & Schantz, 2006), e é também a maior fonte de dados sobre a doença (Carmena et al., 2008). Os procedimentos e ferramentas aplicadas no registo dos resultados da inspecção *post-mortem* em matadouro representam um problema para os planos oficiais de controlo, afectando, por exemplo, a fiabilidade dos dados oficiais sobre hidatidose em ovinos na Sardenha, que estão frequentemente subestimados (Scala & Mazzette, 2009). Acresce que as infecções por hidatidose serão significativamente maiores em animais de criação familiar e cujo abate é geralmente caseiro (Bruzinskaite et al., 2009).

No que diz respeito à investigação no âmbito imunológico, foi desenvolvida uma vacina recombinante que mostrou ser capaz de produzir um alto nível de protecção em ovinos, nomeadamente reduzindo consideravelmente o número de quistos viáveis (Eddi et al., 2006), e prevenindo a infecção (Heath et al., 2003). Também foi desenvolvida uma vacina para o hospedeiro definitivo, que confere 97 a 100% de protecção para o crescimento do parasita adulto e a produção de ovos (Zhang et al., 2006). Foram feitos estudos no sentido de desenvolver formas de protecção imunológica dos hospedeiros intermediários e definitivos, com resultados preliminares prometedores, mas ainda não estão completamente operacionais (Zhang & McManus, 2006, Zhang & McManus, 2008). Um estudo piloto de campo mais recente sobre vacinação de pequenos ruminantes, concluiu que a vacina (EG95) foi capaz de prevenir a infecção em animais até aos três anos, mas no futuro seria importante saber se esta vacina é capaz de prevenir a doença ao longo de toda a vida útil destes ovinos (Larrieu et al., 2013).

6.2. Desparasitação dos carnívoros e controlo dos cães errantes

Epidemiologicamente, a hidatidose humana ocorre predominantemente em comunidades pobres pastoris, de criação de ruminantes, e que mantém cães pastores (Craig et al., 2007). A manutenção desta doença é particularmente importante em regiões com maior iliteracia e assistência veterinária inadequada (Deplazes et al., 2011). As regiões caracterizadas por uma alta densidade de canídeos contribuem fortemente para a transmissão da hidatidose (Varcasia et al., 2007, Deplazes et al., 2011). Acresce que nestas comunidades estes cães mesmo com proprietário circulam livremente pelas localidades, defecando em áreas públicas e em campos, contaminando alimentos e água, e contactando com outros animais e pessoas (Torgerson & Budke, 2003, Himsworth et al., 2010a, Himsworth et al., 2010b). Estes cães, assim como os que tem hábitos predatórios, tem prevalências mais elevadas da doença (Deplazes et al., 2011). A contaminação contínua de pastagens por estes animais tornam a doença difícil de controlar (Singh et al., 2014).

O controlo da hidatidose será muito pouco eficaz sem a colaboração dos proprietários de canídeos (Heath et al., 2006). Este apoio só será conseguido se os indivíduos tiverem entendido claramente o ciclo de vida deste parasita e os factores de risco para a infecção humana, tendo em conta a realidade social e económica da comunidade (Kachani & Heath, 2014). Os cuidados em relação à doença serão proporcionais ao nível educacional e económico da comunidade. No que diz respeito aos canídeos, é importante para o controlo da doença que os que têm proprietário sejam convenientemente desparasitados, e que haja um real controlo dos canídeos errantes (Jimenez et al., 2002, McManus et al., 2003). Alguns dos programas de controlo desta doença passaram por desparasitar os cães de 6 em 6 semanas com praziquantel (Moro & Schantz, 2006), contudo, considerando que o genótipo G6 tem um período de incubação mais curto, há autores que sugerem que este tratamento seja feito de quatro em quatro semanas (Craig & Larrieu, 2006). Esta rotina terá que ser de longa duração para ser efectiva (Deplazes et al., 2011). Estudos que desenvolveram modelos matemáticos referem que a medida de intervenção mais efectiva no controlo da hidatidose seria uma combinação de vacinação de ovinos com desparasitação de cães (Torgerson, 2006b).

É possível controlar *Echinococcus granulosus* em cães com proprietário (Zhang et al., 2014), mas em cães sem proprietário, ou que circulam livremente, é extremamente difícil, e este facto está reportado como o de maior risco para a infecção (Otero-Abad & Torgerson, 2013). O controlo de cães sem proprietário, ou com um proprietário que não se consegue imediatamente identificar, pode ser feito de várias formas, nomeadamente através de controlos de fertilidade ou eutanásia. A importância e forma de manejo destes cães para o controlo da hidatidose foi recentemente revisto por Kachani & Heath (2014). Craig et al. (2007) referem que uma das dificuldades nos programas de controlo da hidatidose é a resistência dos proprietários de cães rurais em manter os cães fechados. Os cães devem ser desparasitados, e as suas fezes durante pelo menos 3 dias após a desparasitação, convenientemente eliminadas (misturadas com lixívia, cal viva ou enterradas). Para esse efeito é necessário confinar os cães pelo menos nos 2 dias seguintes à desparasitação (Taylor et al., 2007). Deve ser evitado o contacto directo com fezes de cão, ou com materiais/equipamentos que possam por elas estar contaminados, caso aconteça, devem ser lavadas as mãos de seguida (CFSPH, 2011). Uma das limitações ao sucesso desta medida preventiva é que um considerável proporção de cães escapa à desparasitação (Torgerson & Budke, 2003), ou porque não tem proprietário, ou porque este simplesmente não a executa, ou executa erradamente (Papazahariadou et al., 2007, Bruzinskaite et al., 2009, Deplazes et al., 2011, Magalhães & Mateus, 2012). Jimenez et al. (2002) referem que apenas 12% dos cães portadores de *Echinococcus granulosus* terão proprietário.

Deve ainda ser proibida a alimentação de cães com vísceras cruas. A cozedura durante 40 minutos ou a congelação a -18°C, durante um mínimo de 48h, é recomendada (Bowman et al., 2004, Kachani & Heath, 2014).

Em Portugal, a produção pecuária extensiva tradicional, em especial de ovinos, com pastores apoiados por cães de gado, associada à falta de educação sanitária das populações e aos abates clandestinos de ovinos, constituem uma fonte de re-infecção dos cães, e estes, quer conspurcando o meio, quer por contacto directo, infectam o Homem com ovos de *Echinococcus granulosus* (David de Moraes, 2010). Não se julgue contudo, que se trata duma zoonose rural, já que a sua ocorrência em áreas urbanas e sobretudo sub-urbanas tem tido um aumento significativo (Acosta-Jamett et al., 2010), devido: à migração de cães infectados por *Echinococcus granulosus*; à crescente interacção entre os animais

silvestres e cães domésticos resultante da caça e outras actividades ao ar livre (Jenkins, 1998, Deplazes & Eckert, 2001, Gortazar et al., 2007, Chomel, 2008); e também pela crescente intimidade/promiscuidade entre os humanos e os cães enquanto animais de companhia (Cardona & Carmena, 2013).

6.3. Melhorar o controlo dos abates - abate ilegal e “caseiro”

Varcasia et al. (2007) referem que regiões onde se pratique abate doméstico associado a condições socio-económicas (indisponibilidade de matadouros na área geográfica, ou existentes mas mal equipados e geridos do ponto de vista higiénico), contribuem fortemente para a transmissão da hidatidose. O tamanho dos quistos pode ser muito variável, variando entre quase imperceptíveis (menor do que um cm) até vários centímetros de diâmetro, escapando mesmo a um olhar mais atento. Daí a importância de a inspecção sanitária ser feita por médicos veterinários habilitados para o efeito. A inspecção sistemática de todos os animais abatidos e a posterior destruição dos órgãos afectados é a forma mais eficaz de interromper o ciclo biológico do parasita e diminuir a incidência da parasitose tanto nos animais como no Homem (Gracey et al., 1999). Num estudo realizado por DeWolf et al. (2012) concluiu-se que as explorações onde os cães pastores se alimentavam (intencionalmente ou não) de carcaças ou restos delas, estavam significativamente associadas a reparações por parasitismo em matadouro. Esta situação é muito vulgar, tendo um estudo descrito que 61% (328/542) dos produtores de ovinos alimentam os seus cães com carne de ovino (Singh et al., 2011). Tal como já foi referido, devido ao baixo valor económico da carne de ovinos adultos estes são muitas vezes abatidos nas explorações e as suas vísceras não são devidamente eliminadas, sendo deixadas no ambiente (Scala & Mazzette, 2009), à mercê dos cães pastores, mas também de outros carnívoros silvestres. Assim, as vísceras infectadas deveriam ser eficazmente eliminadas (McManus et al., 2003). O (mau) comportamento humano permite a perpetuação do ciclo (Craig et al., 2007).

6.4. Boas práticas de caça e dos caçadores

Frequentemente, os matilheiros e/ou os caçadores executam uma má prática que é oferecer as vísceras cruas à sua matilha, estando desta forma a perpetuar ciclos biológicos de parasitoses e infectando deliberadamente os seus cães com possíveis microrganismos patogénicos. Outras vezes, quando se apercebem que os ungulados silvestres estão doentes ou não aptos para consumo próprio estes são abandonados na floresta e depois consumidos quer por carnívoros silvestres, quer por carnívoros errantes, ou até mesmo domésticos (Robertson & Thompson, 2002). Gortazar et al. (2007) defendem então a necessidade de implementar medidas de higiene no sector da caça, relativamente à inspecção das carcaças e destruição dos despojos. Os veterinários que trabalham com animais silvestres podem e devem trabalhar também na protecção da saúde ambiental e da cadeia de produção de alimentos (Frazzoli & Mantovani, 2010).

A interface animais de produção pecuária/animais silvestres é cada vez mais próxima. A título de exemplo podemos referir o facto de estar a ser privilegiada a produção extensiva de animais, e ao mesmo tempo, devido a limitações várias no habitat selvagem, os animais silvestres procuram alimento mais próximo das comunidades urbanizadas, promovendo assim uma maior interacção não só com os animais domésticos, mas com o próprio Homem (Gortazar et al., 2007). É bem conhecido o fenómeno da quase domesticação de raposas e aumento das suas populações, em algumas cidades europeias (Eckert et al., 2000, Deplazes et al., 2011, Carmena & Cardona, 2013), e em Portugal o mesmo fenómeno é descrito na região do Grande Porto, em Vila Nova de Gaia (Pinto et al., 2011). Existem estudos que provaram que efectivamente as raposas são responsáveis pela contaminação ambiental com ovos de *Echinococcus multiloculares* de vilas ou pequenos centros urbanos, aumentando a pressão de infecção para o Homem (Janko et al., 2011).

6.5. Educação para a Saúde e a implementação do conceito “Uma só Saúde”

A Educação para a saúde é uma ferramenta básica na saúde pública veterinária, nomeadamente na prevenção e controlo de zoonoses, como a hidatidose. A educação para a saúde tem sido definida como um processo educativo destinado a tornar tanto indivíduos, como grupos, e a comunidade, responsáveis pela salvaguarda da sua própria saúde e até da das outras pessoas. Implica o envolvimento multidisciplinar entre os profissionais de educação, da saúde e competências na área da comunicação. Requer muita motivação e a participação de toda a comunidade envolvida. Idealmente deve ser dirigida a uma comunidade específica. As mensagens e a sua chegada ao destinatário deveriam ser testadas com uma população alvo. Os materiais educativos devem incluir meios audiovisuais, pósteres, panfletos e outros, nunca esquecendo programas educacionais escolares (Eckert et al., 2001). Essencialmente, pretende-se com a educação para a saúde aumentar a *compliance* da comunidade nas restantes medidas de controlo implementadas (Kachani & Heath, 2014).

O desenvolvimento de estratégias para informar a comunidade do risco e da prevenção das zoonoses deve ser baseado não só nos resultados da investigação científica dos factores de risco, mas também na análise da percepção do problema pela comunidade (Hansen et al., 2003, Slovic et al., 2005). Esta pode diferir de região para região, pelo que a comunicação sobre as medidas de prevenção a serem adoptadas deverão ser adaptadas às situações regionais específicas (Hegglin et al., 2008). Esta questão é referida concretamente para o controlo da hidatidose na região do Mediterrâneo por Seimenis (2003), recordando as festividades locais e religiosas que acontecem associadas a abates tradicionais de animais, e que constituem ocasiões ideais para a propagação da infecção para canídeos e para o Homem. A falta de conhecimento dos humanos sobre a doença permite a perpetuação desta (Arambulo, 1997, Eddi et al., 2004). As comunidades envolvidas na criação de ovelhas têm habitualmente as mais altas taxas de infecção, demonstrando que o ciclo ovelha-cão tem muita importância do ponto de vista da saúde pública (Bardonnet et al., 2003, McManus et al., 2003, Sotiraki et al., 2003, Craig et al., 2007, Carmena et al., 2008), pelo que estas comunidades serão um *setting* prioritário. A mudança de comportamento humano é certamente o maior desafio. Os profissionais de saúde

pública são o elemento chave na educação para a saúde nas doenças zoonóticas. Vários estudos demonstram que a comunidade médica “delega” nos médicos veterinários a função de educação para a saúde relativamente às zoonoses (Chomel, 2008). Esta convicção é partilhada por mais autores (Grant & Olsen, 1999). Contudo também os médicos veterinários precisam de estar sensibilizados para esta sua função, uma vez que um estudo concluiu que apenas 44% dos veterinários clínicos de animais de companhia, informava os seus clientes do risco zoonótico relativamente aos endoparasitas dos seus animais de companhia (Stull et al., 2007). Outros autores referem valores semelhantes e acrescentam que 90% dos proprietários no seu estudo, gostariam que os veterinários os esclarecessem sobre as zoonoses (Pfukenyi et al., 2010). A formação contínua dos médicos veterinários e a informação dos proprietários de animais são por isso prioritárias (Deplazes et al., 2011).

Numa zona endémica de Marrocos foi desenvolvido um programa de educação para a saúde que aliou um rastreio à hidatidose humana numa comunidade (baseado na realização de ecografias), à explicação do ciclo de vida, das manifestações clínicas e das formas de prevenção da doença dada pelos profissionais de saúde. Os rastreios são uma forma importante de informar uma comunidade e neste em particular, os profissionais de saúde confirmaram a falta de conhecimentos sobre a doença da população intervencionada (Kachani et al., 2003). No Chile, Apt et al. (2000) realizaram um trabalho na hidatidose em 3 frentes: diagnóstico da doença animal, diagnóstico da doença humana e avaliação de conhecimentos e intervenção educativa numa comunidade rural e em profissionais de saúde, da agropecuária e da educação. A avaliação dos conhecimentos concluiu que 738 famílias (55%) demonstraram não saber nada sobre a doença. Desenvolveram então uma técnica de participação activa da comunidade para a educação para saúde na hidatidose, baseada em 3 jogos: um primeiro para motivar a assistência, um segundo que proporcionou informação sobre o ciclo de vida, formas de transmissão, controlo e prevenção da doença, e um terceiro para avaliação da aprendizagem. O processo educativo foi avaliado mediante a realização de uma prova de conhecimentos antes e três meses depois da intervenção, tendo-se concluído que as técnicas de participação activa e lúdica se adequaram a essa comunidade. Neste estudo a formação estendeu-se também aos profissionais de educação e da saúde, mas desta feita duma forma mais

formal. A participação activa da comunidade torna o processo de controlo da doença mais sustentável (Kachani & Heath, 2014).

A educação da população para a saúde nesta área é urgente, devendo-se começar pelas regras básicas em campanhas de informação para a comunidade em geral, dando ênfase aos princípios básicos de higiene, em vez de pormenores, evitando um excesso de informação que pode cursar com uma redução da percepção do risco. Já para os grupos de risco, essa informação deverá ser mais específica e concreta (Warriner & Namvar, 2009). A educação para a Saúde na prevenção da hidatidose poderia começar por referir cuidados gerais como a lavagem e desinfecção de vegetais e frutas a consumir cruas, o não consumo de água não tratada, e a frequente lavagem das mãos, sobretudo depois de realizar trabalhos agrícolas, pecuários ou de jardinagem (CFSPH, 2011, Kachani & Heath, 2014).

7. Objectivos gerais e específicos do estudo

Os dados oficiais relativos à hidatidose humana mostram que a doença estará em declínio em Portugal. Contudo, gostaríamos de ressaltar aqui dois factos: por um lado, a clara subnotificação de novos casos, por outro, a recente ocorrência de casos em crianças, o que revela um carácter “activo” da doença. Acresce ainda que a população inserida em grupos de risco está a aumentar (quer devido ao envelhecimento da população, quer devido ao número crescente de pessoas que padecem de doença crónicas). Por fim, todas as alterações antropogénicas, a emergente procura do mundo rural para actividades lúdicas, e a urbanização de animais silvestres, expõe de uma nova forma o Homem a esta parasitose.

A escassez de dados epidemiológicos sobre a doença nos animais é referida por um perito da OMS, como uma das principais causas para a falha na prevenção desta doença. Assim, o objectivo geral deste estudo é contribuir para o conhecimento epidemiológico da equinococose-hidatidose na população animal em Portugal.

Em Portugal, tanto quanto julgamos saber, os estudos realizados em hidatidose animal são escassos e aconteceram essencialmente na zona centro e sul do país (Conceição et al., 2007, Beato et al., 2010; Beato et al., 2013) e na zona norte (Castro et al., 2006) em Trás-os-montes, e mais concretamente em Vinhais. Considerando que não era exequível fazer um estudo nacional, e que a

recolha de dados à escala regional é importante para planificar estratégias de controlo adaptadas à realidade social, cultural e económica, optamos por direccionar uma parte do nosso trabalho apenas para um Concelho do Minho, Ponte de Lima. O Concelho de Ponte de Lima pertence ao Distrito de Viana do Castelo, tem 43,498 habitantes dispersos por 51 freguesias, numa área de 320.26 km² (INE, 2011). Trata-se dum Concelho onde a principal actividade é a produção agrícola e pecuária em explorações relativamente pequenas e geralmente familiares. O forte crescimento turístico na região gerou um aumento da população, sobretudo no Verão e em dias festivos, e uma urbanização de áreas tradicionalmente rurais, transformando o ambiente e criando condições favoráveis à interacção entre o Homem e os animais.

Os objectivos específicos deste trabalho foram:

- Estimar os conhecimentos, a percepção e as atitudes de criadores de ovinos e caprinos do Concelho de Ponte de Lima em relação às zoonoses parasitárias em geral e à hidatidose em particular, assim como identificar as vias de transmissão de informação sobre a doença preferidas pelos criadores
- Avaliar a ocorrência de parasitas zoonóticos intestinais, com especial ênfase para *Echinococcus granulosus*, em amostras de cães de diferentes grupos (amostras ambientais, de cães de caça e de cães de exploração) no Concelho de Ponte de Lima
- Avaliar a ocorrência de parasitas zoonóticos intestinais, com especial ênfase para *Echinococcus granulosus*, em amostras de carnívoros silvestres no Concelho de Ponte de Lima e regiões limítrofes
- Estimar a ocorrência de lesões compatíveis com hidatidose (LCH) em ungulados silvestres em montarias no Concelho de Ponte de Lima e regiões limítrofes
- Estimar a ocorrência de LCH em ungulados domésticos em matadouros da região norte e centro do país
- Determinar a precisão da inspecção sanitária, apenas por visualização e palpação, para a classificação de LCH
- Identificar os genótipos dos quistos hidáticos encontrados e confirmados por técnicas de biologia molecular

Capítulo II

Metodologia

A metodologia geral deste trabalho passou essencialmente pelos seguintes pontos: inquéritos em explorações de pequenos ruminantes, coprologia parasitária de hospedeiro definitivo, identificação e recolha de lesões compatíveis com quisto hidático em hospedeiro intermediário e por fim, análise genética destas lesões.

1. Inquéritos aos criadores de ovinos e caprinos

No Concelho de Ponte de Lima, à data do início deste trabalho (Dezembro de 2010), existiam 796 explorações de pequenos ruminantes oficialmente registradas. Foi através da Organização de Produtores Pecuários (OPP) de Ponte de Lima que conseguimos mais facilmente contactar e comunicar com os criadores, motivo pelo qual a nossa amostragem foi de conveniência, na medida em que dependíamos da disponibilidade e do Edital da OPP.

A construção do questionário começou pela leitura prévia de literatura científica sobre a hidatidose. Posteriormente foram organizadas reuniões com grupos de criadores com o objectivo de recolher informação para o rascunho da entrevista exploratória. Esta foi depois testada, e baseado nos seus resultados, foi desenhado o questionário. O questionário foi ainda testado e revisto especialmente no que aos termos técnicos dizia respeito, de forma a ser entendível por todos os criadores. O questionário final era composto por 20 questões remetentes para categorias de escolha, mas também questões abertas. Em algumas questões foram deixados espaços sem referências, de forma a poderem ser incluídas possibilidades para além das previstas. As questões recolheriam informação relativa a dados socio-demográficos dos criadores, número e espécie de animais que possuíam, práticas de risco, conhecimento sobre a doença, interesse em receber informação e vias de acesso a essa informação preferidas (Anexo I). Todos os questionários foram administrados pessoalmente e preenchidos por nós. Na questão “Já viu quistos...”, eram mostradas fotografias com quistos hidáticos. No final do questionário foi entregue um panfleto informativo relativo à doença.

O tratamento estatístico foi realizado com recurso ao software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 18.0, e incidiu sobre a construção de tabelas de frequências, e, para os testes de associação, sobre a construção dos

testes de qui-quadrado. Nestes testes houve a preocupação de analisar, antes de mais, os valores relativos e, também, de evidenciar as associações estatisticamente relevantes consequentes do cruzamento entre categorias de variáveis, tendo como referência o grau de erro inferior a cinco por cento ou significância estatística ($p < 0,05$) e o teste associado V. Cramer, a variar entre 0 e 1, que permite uma leitura do grau de intensidade da associação entre variáveis. Embora não exista uma padronização na leitura dos valores deste teste, consideram-se aqui dignas de registo as associações superiores a 0,300 (Pestana & Gageiro, 1998).

2. Coprologia parasitária do cão doméstico

No Concelho de Ponte de Lima existem entre 1100 e 1500 cães registrados (comunicação pessoal da médica veterinária municipal), contudo, muitos destes cães não estão presos, circulando livremente pelas localidades. Existem também muitos cães que tendo dono não estão oficialmente registrados, pelo que o tamanho real da população de cães é desconhecido.

2.1. Recolha de amostras

As amostras de cão foram recolhidas em 3 momentos diferentes, consoante o grupo a que se referiam, entre Novembro de 2011 e Dezembro de 2012. As amostras ambientais foram recolhidas aleatoriamente em locais públicos (preferencialmente em locais frequentados por pessoas como parques verdes e infantis, centros de localidades, entre outros), percorrendo a pé as 51 freguesias do Concelho de Ponte de Lima. Para a colheita de amostras de cães de explorações de ruminantes, foram visitadas 300 explorações, e foram recolhidas amostras em 141. As amostras de cães de caça foram recolhidas em montarias ao javali no Concelho e de 24 matilhas. A recolha foi efectuada sempre que possível imediatamente após eliminação, e as amostras colocadas em recipientes plásticos, individualmente identificados, e posteriormente guardadas em refrigeração até serem processadas (o que aconteceu no máximo dois dias depois da recolha).

2.2. Coprologia parasitária qualitativa de flutuação – Método de Willis

Cada amostra foi examinada macroscopicamente para a detecção de possíveis proglótides presentes. O método qualitativo de flutuação foi executado de acordo com o descrito na literatura (Foreyt, 2001). A identificação das formas parasitárias foi feita com base nas características morfológicas (forma e estrutura) e dimensões das formas parasitárias (Thienpont et al., 1986, Foreyt, 2001, Zajac & Conboy, 2012).

2.3. Fraccionamento da amostra com gradiente de Percoll

Nas amostras onde foram identificados ovos da família Taeniidae procedeu-se a um fraccionamento com um gradiente descontínuo de *Percoll* (ref. 17-0891-01, GE Healthcare, Amersham Biosciences Limited, Amersham, UK), de forma a limpar parcialmente a amostra e concentrar estes ovos para facilitar a posterior análise de biologia molecular, que avaliará a presença de *Echinococcus granulosus*. O gradiente de *Percoll* baseia-se na densidade dos ovos dos helmintes. A avaliação do gradiente de *Percoll* foi feita de acordo com o já previamente descrito (Cardoso et al., 2014).

2.4. Análise de biologia molecular para identificação de *Echinococcus granulosus*

Após o fraccionamento com o gradiente de *Percoll*, foi extraído o DNA total com um Mini Kit DNA QIAamp (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante para a extracção de DNA de tecidos. A presença de *Echinococcus granulosus* foi avaliada usando a técnica de PCR. Para cada amostra foram realizadas reacções de PCR para a amplificação de *Echinococcus granulosus repeated sequence* (ERS) (Abbasi et al., 2003). O resultado foi analisado por electroforese. Para os controlos positivos foram usadas amostras de DNA obtidas de quistos hidáticos e de amostras de fezes positivas para a presença de *Echinococcus granulosus*. Estes controlos foram efectuados usando reacções de PCR seguidas de sequenciação dos fragmentos de DNA amplificados.

3. Coprologia parasitária do hospedeiro definitivo silvestre

3.1. Recolha de amostras

Recolher amostras de carnívoros silvestres é uma tarefa compreensivelmente complexa. No Concelho de Ponte de Lima existe a Área Protegida das Lagoas de Bertandos e S. Pedro D'Arcos, pelo que foi solicitada colaboração aos técnicos ambientais desta Área Protegida para a recolha de amostras de carnívoros silvestres, entre Junho de 2011 e Junho de 2012. Durante as montarias que acompanhamos nas épocas venatórias dos anos de 2011-2012 e 2012-2013 também foi solicitada colaboração aos caçadores na recolha de amostras de carnívoros silvestres.

Em colaboração com uma empresa de consultoria ambiental da Galiza (A.RE.NA. Asesores en Recursos Naturales), recolhemos ainda amostras de lobo ibérico (*Canis lupus signatus*) em alcateias do norte de Espanha, nomeadamente de áreas raianas de Portugal, entre Junho de 2012 e Setembro de 2013.

As amostras foram colocadas em recipientes plásticos, individualmente identificados, e posteriormente guardadas em refrigeração até serem processadas. O método coprológico efectuado já foi descrito no ponto 2.2.. No caso das amostras de lobo ibérico, usamos ainda outro método, que descrevemos de seguida em 3.2.

3.2. Coprologia parasitária qualitativa de sedimentação – Método de *Ritchie*

O método de *Ritchie* permite analisar a presença ou ausência de ovos de parasitas por sedimentação com formol-éter. Em termos de protocolo procede-se do seguinte forma: misturaram-se duas g de fezes com aproximadamente 10 vezes o seu volume de formol a 10%. Seguidamente a suspensão é filtrada por duas camadas de gaze colocadas sobre um funil de vidro e recebida num tubo cónico de centrífuga. Centrifuga-se o filtrado durante 10 minutos à velocidade de 1200 rpm e despreza-se o sobrenadante. Adicionam-se sete a oito ml de formol a 10%, agita-se cuidadosamente e deixa-se repousar durante 10 minutos, findos os quais se juntam dois a três ml de éter, e após tapar bem o tubo agita-se a suspensão vigorosamente. Volta a centrifugar-se por um minuto a 800 rpm.

Desta última centrifugação resultarão quatro camadas: uma camada de sedimento no fundo do tubo onde se encontram concentrados os ovos de helmintes, uma camada de formol, um rolhão de restos fecais, e finalmente uma camada de éter à superfície. Pode-se desprezar num só movimento a camada mais superficial e o sedimento está pronto a ser observado ao microscópio, em preparação de lâmina e lamela.

4. Recolha de LCH em hospedeiro intermediário doméstico

Para a recolha de LCH, entre Dezembro de 2010 e Dezembro de 2012, acompanhamos – presencialmente ou em colaboração com médicos veterinários inspectores - o abate de ungulados num total de 8 matadouros localizados essencialmente no Norte, mas também no Centro do país. Para cada amostra foi preenchido um formulário com indicação da espécie, origem geográfica do animal e órgão ou órgãos afectados. Cada amostra foi mantida em refrigeração até à chegada ao laboratório onde outras análises foram efectuadas (ponto 6.).

5. Recolha de LCH em hospedeiro intermediário silvestre

Para a recolha de LCH em hospedeiros intermediários silvestres, acompanhamos montarias na região do Alto Minho nas épocas venatórias dos anos de 2011-2012 e de 2012-2013, e contamos com a colaboração de alguns colegas inspectores sanitários em montarias de outras regiões.

Para cada amostra foi preenchido um formulário com indicação da espécie, origem geográfica do animal e órgão ou órgãos afectados. Cada amostra foi mantida em refrigeração até à chegada ao laboratório onde outras análises foram efectuadas (ponto 6.).

6. Análise macro e microscópica de LCH em laboratório

No laboratório, todas as LCH foram macroscopicamente examinadas e fotografadas (Figura 2.1.). Foi ainda registado se se tratava de uma lesão múltipla ou única.



Figura 2.1 - Pulmão e fígado de ovino com LCH (Original)

Posteriormente, foram realizadas incisões às lesões para avaliar a presença de líquido hidático (Figura 2.2), areia hidática, vesículas filhas (Figura 2.3) ou membranas germinativas (Figura 2.4).



Figura 2.2 - Presença de líquido hidático em quisto hidático pulmonar de ovino (Original)



Figura 2.3 - Vesículas filhas de quisto hidático hepático de bovino
(Original)



Figura 2.4 - Membrana germinativa de quisto hidático hepático de bovino
(Original)

Se alguma destas estruturas estivesse presente era considerada de facto uma LCH e este material biológico era guardado a -18°C para posterior análise de biologia molecular. Com o líquido hidático foi ainda realizada uma preparação

lâmina-lamela para visualização de protoescólices (Figura 2.5) no microscópio óptico, de forma a averiguar da fertilidade destes quistos.

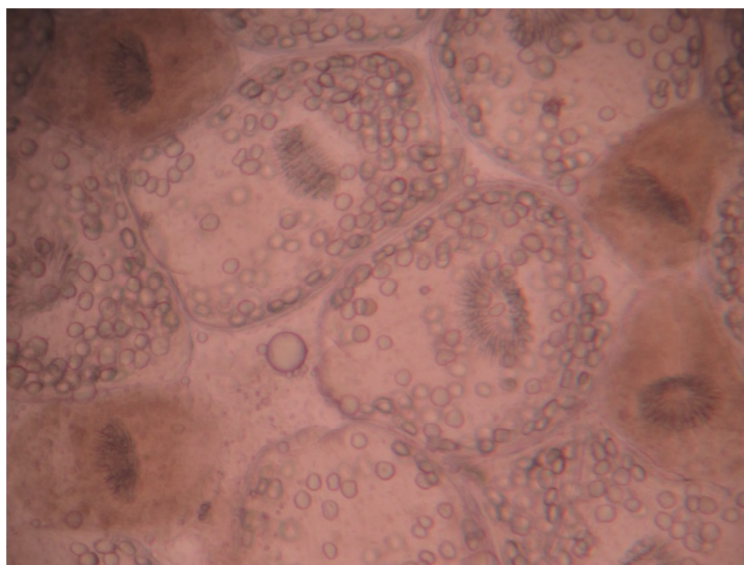


Figura 2.5 – Protoescólices em quisto hidático pulmonar de ovino
(MO, 40x) (Original)

As lesões que não tinham líquido hidático, areia hidática, vesículas filhas ou membranas germinativas foram classificadas como não compatíveis com hidatidose. A partir das lesões não compatíveis foram criadas duas categorias:

- Lesões suspeitas: as que apresentavam no seu conteúdo um material acinzentado sólido ou semi-sólido, envolto em tecido conjuntivo, relacionado possivelmente com uma infecção crónica. Estas lesões foram fixadas em formol a 10% e enviadas para exame histológico.
- Lesões não suspeitas: as que apresentavam lesões macroscópicas distintas de hidatidose e sugestivas de outras patologias facilmente identificadas.

7. Análise histológica de lesões suspeitas mas não compatíveis com hidatidose

As amostras fixadas em formol a 10% foram sujeitas a exame histológico. O tecido foi processado, tendo sido embebido em cera de parafina, seccionado em porções de três μ m e corado com hematoxilina-eosina para observação em microscópio óptico.

8. Análise por técnicas de biologia molecular das LCH para confirmação e genotipagem

A análise de biologia molecular para identificação de *Echinococcus granulosus* foi realizada de acordo com o descrito em 2.4. No que diz respeito à genotipagem procedeu-se de acordo com os pontos seguintes.

8.1. Análise de fragmento da NADH desidrogenase I

Após a identificação de *Echinococcus granulosus* usando a amplificação do fragmento ERS, foi feita a análise de fragmentos de genes do DNA mitocondrial, nomeadamente de um fragmento da NADH desidrogenase I – NAD, considerado como referência neste tipo de trabalhos. O protocolo foi seguido de acordo com o previamente descrito (Bowles et al., 1992, Bowles & McManus, 1993).

Após a realização das reacções de PCR, os produtos PCR resultantes foram submetidos a um processo de purificação com o kit *Illustra™ GFX PCR DNA & Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

8.2. Sub-clonagem no vector pGEM-T

As ligações dos produtos de reacção de PCR ou de digestão enzimática ao vector pGEM foram feitas através duma mistura que consistia em três µL de amostra de DNA, um µL de vector pGEM-T Easy (Promega), cinco µL de tampão ligase 2x (Promega) e um µL de enzima ligase T4 DNA (Promega), até um volume final de dez µL. A reacção de ligação ocorreu à temperatura ambiente *overnight* ou a 37°C durante uma hora e meia.

A estirpe de *Escherichia coli XL1 Blue* (Stratagene) foi usada para subclonar o vector pGEM-T Easy vector (Promega). As células de *E. coli XL1 Blue* foram transformadas com estas ligações, e foram realizadas culturas em LB agar contendo ampicilina, X-Gal e IPTG, e incubadas *overnight* a 37°C, de acordo com o protocolo do fabricante. As colónias brancas foram transferidas para culturas líquidas de LB contendo ampicilina e o DNA do plasmídeo foi posteriormente purificado das culturas bacterianas usando o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA*

Purification System (Promega), e o protocolo fornecido pelo fabricante. A verificação dos clones foi feita por digestão enzimática com a enzima EcoRI (Promega), consistindo esta na mistura de sete µL de clones seleccionados, dois µL de tampão H 10x e um µL de enzima EcoRI, completando um volume final de dez µL. A digestão enzimática ocorreu durante duas a três horas a 37°C e o DNA digerido resultante foi observado em gel de agarose.

8.3. Sequenciação e análise de dados

As amostras foram enviadas para sequenciação pela *Eurofins MWG Operon* (Germany). Os resultados das sequenciações foram analisados usando as ferramentas do BLAST e a base de dados de sequências de DNA do NCBI.

Capítulo III

Conhecimentos e práticas dos criadores de ovinos e caprinos relativamente a *Echinococcus granulosus*

Na sequência do trabalho desenvolvido neste capítulo foram apresentadas as seguintes comunicações em congressos internacionais:

- Mateus, T. L., Ribeiro, J.N., Castro, A. Vieira-Pinto, M.M. (2014). Limited knowledge about hydatidosis among farmers in Ponte de Lima – Portugal - and its impact in Public Health. III International Congress on Environmental Health. Health Sciences School of Polytechnic Institute of Porto, Portugal. 24 - 26 September 2014. Porto. Portugal (comunicação oral).

- Mateus, T. L., A. Castro, J. N. Ribeiro, Vieira-Pinto, M. M. (2012). Awareness of hydatidosis among northern portuguese sheep farmers and its impact in public health. II International Congress on Environmental Health. 29 May – 2 June 2012. Lisbon. Portugal (comunicação oral).

Foi publicado um artigo em revista tecnico-científica nacional a convite:

- Mateus, T. L., Vieira-Pinto, M. M. (2013). Novos tempos, velhas doenças. Equinococose-hidatidose, uma zoonose a respeitar! Agrotec – revista tecnico-científica agrícola. Nº 7. Pp: 14 – 20 (Anexo II)

Foi ainda submetido um manuscrito à revista EcoHealth:

“Limited knowledge about hydatidosis among farmers in the northwest of Portugal – One Health approach is a pressing need”

Capítulo IV

***Echinococcus granulosus* em cão doméstico**

(Canis lupus familiaris)

Na sequência do trabalho desenvolvido neste capítulo foram apresentadas as seguintes comunicações em congressos nacionais e internacionais:

- Mateus, T. L., Vieira-Pinto, M.M., Ribeiro, J.N., Castro, A. (2014). Environmental contamination by dog feces with zoonotic helminths and human infection risk in Ponte de Lima Portugal. III International Congress on Environmental Health. Health Sciences School of Polytechnic Institute of Porto, Portugal. 24 - 26 September 2014. Porto. Portugal (comunicação oral).

- Mateus, T. L., Ribeiro, J. N., Vieira-Pinto, M. M., Castro, A. (2013). Hunting dogs in Ponte de Lima, Portugal – a spreading threat between wildlife, livestock and humans? VIII International Symposium on Wild Fauna. Universidad de León. 31 de Octubre – 3 Noviembre 2013. León. España (comunicação oral).

- Magalhães, R., Matos, A., Mateus, T. L. (2012). O papel dos cães de caça de Ponte de Lima na transmissão de parasitas intestinais a animais selvagens. IV Congresso da Fauna Selvagem WAVES Portugal. 28 - 29 Setembro 2012. Bragança. Portugal (comunicação em painel).

Foi ainda publicado um artigo em revista internacional com arbitragem científica:

“Multiple Zoonotic Parasites Identified in Dog Feces Collected in Ponte de Lima, Portugal—A Potential Threat to Human Health”.

Int. J. Environ. Res. Public Health **2014**, *11*, 9050-9067; doi:10.3390/ijerph110909050

Capítulo V

***Echinococcus granulosus* em lobo ibérico**

(Canis lupus signatus)

Na sequência do trabalho desenvolvido neste capítulo foram apresentadas as seguintes comunicações em congressos nacionais e internacionais:

- Mateus, T. L., Vieira-Pinto, M. M., Ribeiro, J. N., Llaneza, L., Castro, A. (2013). Iberian wolves intestinal helminths diversity in Northern Spain – comparing coprological methods. VIII International Symposium on Wild Fauna. Universidad de León. 31 de Octubre – 3 Noviembre 2013. León. España (comunicação oral).
- Mateus, T. L., Llaneza, L., Castro, A., Ribeiro, J. N., Vieira-Pinto, M. M. (2012). Diversidade e prevalência de helmintes intestinais em fezes de lobo ibérico no Norte de Espanha - dados preliminares. III Congresso Ibérico do Lobo. Universidade de Santiago de Compostela. 23 a 25 de Novembro 2012. Lugo. España (comunicação em painel).
- Matos, A., Magalhães, R., Llaneza, L., Mateus, T. L. (2012). Contribuição para o conhecimento da diversidade de helmintes intestinais de lobos do Norte de Espanha por coprologia parasitária - dados preliminares. IV Congresso da Fauna Selvagem WAVES Portugal. 28 – 29 Setembro 2012. Bragança. Portugal (comunicação em painel).

Foi ainda realizado um manuscrito para submissão:

“Prevalence and diversity of intestinal helminths in Iberian wolves (*Canis lupus signatus*) from Ancares - northern Spain”

Prevalence and diversity of intestinal helminths in Iberian wolves (*Canis lupus signatus*) from Ancares - northern Spain

Authors: A. Castro¹, J. N. Ribeiro^{2,3}, L. Llana⁴, M. M. Vieira-Pinto⁵, T. L. Mateus^{2,3,5,6}

¹ ICETA/CECA, University of Porto, Public Health Centre Dr. Gonçalves Ferreira, National Institute of Health, Rua Alexandre Herculano, 321, 4000-055 Porto, Portugal;

² Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal;

³ EpiUnit, Epidemiology Research Unit, Institute of Public Health of the University of Porto, Rua das Taipas, nº 135, 4050-600 Porto, Portugal

⁴ A.RE.NA. Asesores en Recursos Naturales S.L., Lugo, Espana;

⁵ Animal and Veterinary Research Centre, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Quinta dos Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal;

⁶ Veterinary Medicine Department, Vasco da Gama University School, Av. José R. Sousa Fernandes, Campus Universitário—Bloco B, Lordemão, 3020-210 Coimbra, Portugal

ABSTRACT

Wild canids are under several pressures, including habitat loss, fragmentation and disease. Parasitism is an important factor regarding biodiversity conservation. The aim of this study is to contribute to the knowledge of iberian wolves (*Canis lupus signatus* CABRERA, 1907) intestinal helminths prevalence and diversity in northern Spain. For this purpose, between April and July 2012, 100 iberian wolf fecal samples were collected from environment and qualitative coprological analysis (Willis and Ritchie – flotation and sedimentation methods respectively) was performed. Parasitic forms were found in 54,0% (flotation) and 59,0% (sedimentation) of the samples. *Trichuris* spp. eggs were the most frequently found, followed by Ancylostomatidae, Taenidae, *Toxocara* spp., *Dicrocoelium* spp. and *Spirocerca* sp. eggs. Larvae were also found in 15,0% (flotation) and 50,0% (sedimentation) of the samples, but it has not been possible to distinguish if they were parasites or free-living Nematoda. In 35,0% (flotation) and 44,0% (sedimentation) of the samples, multiple parasites were observed (more than two

types of parasites). Despite the samples origin (environmental) and the fact that they were not fresh, it was observed a high positive frequency. The methods used were qualitative, not allowing us to quantify the degree of wolves infection, nevertheless, almost all the parasitic forms found were zoonotic, which suggests the need for all those working in nature and biodiversity conservation to maintain biosecurity measures, preventing also their own infection.

Key words: Coprology, Helminths, Wolf, Zoonoses

INTRODUCTION

Wild canids are under various pressures, including habitat loss and disease (Curi *et al.*, 2010). Parasitism is the main ecological constraint for wildlife and represents an important factor in conservation. Thus, the systematic or case report, health monitoring of these animals, provides important information for understanding the parasite presence/prevalence (Cansi *et al.*, 2012). Moreover, wild carnivores harbour a great variety of helminths that could be transmitted to both domestic animals and humans, playing a main role in the diffusion of zoonoses, which should not be underreported (Di Cerbo *et al.*, 2008). In order to get information about the helminth fauna of wolves, studies have been carried out in some European countries: Kazakhstan (partially European) (Abdybekova & Torgerson, 2012), Finland and Sweden (Lavikainen *et al.*, 2011), Latvia (Bagrade *et al.*, 2009), Belarus (Shimalov & Shimalov, 2000), Poland (Popiolek *et al.*, 2007; Szafranska *et al.*, 2010), Slovakia (Martinek *et al.*, 2001), Greece (Papadopoulos *et al.*, 1997), Italy (Guberti *et al.*, 1993), and finally in Portugal (Torres *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2013) and in Spain (Torres *et al.*, 2000, 2001; Segovia *et al.*, 2001, 2003). Most studies on Iberian wolf helminth fauna are performed through necropsy (Torres *et al.*, 2001) however the parasitological coprology offers some advantages, as it is non-invasive and relatively easy to obtain samples (Torres *et al.*, 2000). In the Cantabrian Mountains the wolves are being monitored since the mid 80's of the last century, and mostly in Asturias, northern Spain (Llaneza *et al.*, 2009).

The aim of this study is to contribute to the study of the presence and diversity of intestinal helminths knowledge in Iberian wolves from Ancares in northern Spain.

MATERIAL and METHODS

During regular field work between April and July 2012, 100 iberian wolf fecal samples were collected in northern Spain (Ancares, Cantabrian Mountains) in the wolf population monitoring (Llaneza *et al.*, 2009). These samples were placed in plastic containers, stored at 4°C and then frozen at -18°C before processing. Qualitative coprological analyzis (Willis and Ritchie – flotation and sedimentation methods, respectively) was performed (Kaufmann, 1996; Foreyt, 2001). Eggs identification was based on morphological characteristics (shape and structure of shell) and measurements. Most of the parasitic forms have been clustered in families/genera (except *Toxascaris leonina*) due to the difficulty to identify species from their eggs.

RESULTS and DISCUSSION

Recognized parasitic forms were found in 54,0% (flotation) and 59,0% (sedimentation) of the samples. Very similar results (56,2%) were obtained by Popiolek *et al.* (2007) in Southern Poland (N=89). Also in Poland, Szafranska *et al.* (2010) identified parasites in 88,4% (N=23) of the samples. In Belarus, Shimalov & Shimalov (2000) study prevalence was 80,0% (N=52), but by necropsy. Segovia *et al.* (2001) in Spain, refer 95,7% and Torres *et al.* (2000) reached 100% (N=20) with samples collected in northern Spain, but all by necropsy. Torres *et al.* (2000) also analyzed by coprology 26 samples from Portugal, and 73,1% of them were parasitized. This is in agreement with those reported by Torres *et al.* (2001), coprological prevalence were almost always significantly lower than those evidenced by necropsy. Despite in our work the samples were environmental and not fresh, it was observed a high frequency of positivity.

At least seven different helminths have been identified in this study: *Trichuris* spp., *Ancilostomatidae*, *Taenidae*, *Toxocara* spp., *Dicrocoelium* spp., *Spirocerca* sp. and *Toxascaris leonina*. The list of wolf parasites identified is shown in Table 1 according to the coprological method used.

Table 1 - Parasite prevalence in faecal samples according to the method used

Parasites/Method	Parasites Prevalence (%)	
	Flotation (n)	Sedimentation (n)
Negative	46	41
<i>Trichuris</i> spp.	40	38
Ancylostomatidae	17	30
Taenidae	8	4
<i>Toxocara</i> spp.	5	6
<i>Dicrocoelium</i> spp.	1	3
<i>Spirocerca</i> sp.	0	2
<i>Toxascaris leonina</i>	0	1
TOTAL	100	100

The parasites identified in our study have been detected in the majority of studies carried out in Europe (unless *Dicrocoelium*). *Trichuris* eggs were the most frequently identified (40,0% in flotation, 38,0% in sedimentation). This result was higher than the one presented by Torres *et al.* (2000) who found lower prevalence either in necropsy (10,0%) or in coprology (11,5%), and Abdybekova & Torgerson (2012) in Kazakhstan, that reported a prevalence of 19,5%. In other Spanish study, with wolves and another wild carnivores, *Trichuris* prevalence (28,0%) was closer to our, but still lower (Torres *et al.*, 2001). Human can be infected by *Trichuris vulpis*, even if there is some reluctance to consider this disease as zoonotic, some cases where already reported (Barriga, 2002; Dunn *et al.*, 2002; Di Cerbo *et al.*, 2008). *Trichuris* were followed in frequency by Ancylostomatidae (17,0% in flotation, 30,0% in sedimentation). These have been the most frequent parasites in Popiolek *et al.* (2007) and Szafranska *et al.* (2010) studies, both in Poland, as well as for Torres *et al.* (2000) in Portugal, although with higher frequencies than our study. Ancylostomatidae parasites are frequent in wild carnivores, and can cause high morbidity, mainly because they are hematophagous (Baños *et al.*, 1999). Besides Ancylostomatidae human infections may cause *Larva Migrans Cutanea* syndromes (Robertson & Thompson, 2002; Barriga, 2003).

Taenidae eggs frequency of positivity (8,0% in flotation, 4,0% in sedimentation) has been very close to *Toxocara* (5,0% in flotation, 6,0% in

sedimentation). Torres *et al.* (2000) study emphasized that for Taeniidae, differences between coprology and necropsy can be huge, as they identified these parasites in 15,4% (coprology) and 95,0% (necropsy) of the samples. This statement was later underlined by Torres *et al.* (2001). Popiolek *et al.* (2007) recorded these parasites in 11,2% of the samples, and Abdybekova & Torgerson (2012) in 51,2%. Taenidae eggs are immediately infective (Eckert & Deplazes, 2004) and environmentally resistant (Jenkins *et al.*, 2011). Concerning to public health, *Echinococcus* spp. eggs are morphologically indistinguishable from *Taenia* spp. Despite Segovia *et al.* (2001) and Torres *et al.* (2001) in their studies in iberian wild canids and wolves helminths in Spain, found positive samples for *Taeniidae* in coprology, and none *Echinococcus* spp. in necropsy, Sobrino *et al.* (2006) reported *Echinococcus granulosus* in 15,0% of the intestinal wolf samples from Spain. Besides, according to Gutierrez *et al.* (2003), in northern Spain, *E. granulosus* is considered the most important parasitic zoonosis. Hence, considering the recent population increase of the wolf in Spain, this canid must be taken into account as a relevant definitive host in the epidemiology and control of *E. granulosus* (Sobrino *et al.*, 2006).

Regarding to *Toxocara* spp. frequencies in our study (5,0% in flotation, 6,0% in sedimentation), they are very similar to the one found by Segovia *et al.* (2001) in Spain and Popiolek *et al.* (2007) in Poland (5,6%), but again much lower than the recorded by Torres *et al.* (2000) in their study in Portugal (38,5%) or Abdybekova & Torgerson (2012) in Kazakhstan (39,0%). Popiolek *et al.* (2007) suggested that the *Toxocara* eggs could be washed out of the fecal sample, by rain or thawing snow, and we think this is a reasonable hypothesis to explain the apparent low prevalence also in our study. *Toxocara* human infections can cause *Larva Migrans Visceral* and/or *Ocular* (Robertson & Thompson, 2002; Saredi, 2002; Barriga, 2003).

Dicrocoelium spp. (1,0% in flotation, 3,0% in sedimentation), *Spirocerca* sp. (2,0% only in sedimentation) and *Toxascaris leonina* (1,0% only in sedimentation) eggs have been found residually, and mostly with sedimentation method.

The same frequency (1,1%) for *Toxascaris leonina* is described by Popiolek *et al.* (2007) and a higher (4,2%) by Segovia *et al.* (2001) in Spain. However, Abdybekova & Torgerson (2012) found them in 19,5% of the samples. Jenkins *et*

al. (2011) and Okulewicz *et al.* (2012) refer *Toxascaris leonina* as having the potential to cause human disease as emerging zoonosis.

Dicrocoelium and *Spirocerca* were not recorded by Torres *et al.* (2000), Segovia *et al.* (2001), Popiolek *et al.* (2007) and Abdybekova & Torgerson (2012). Torres *et al.* (2001) identified *Fasciola hepatica* eggs, an ungulate liver fluke, like *Dicrocoelium*. The shedding of *Dicrocoelium dendriticum* eggs in the faeces of ruminants occurs uninterruptedly throughout the year in north-west Spain, and the survival of these eggs is very high (Manga-González & González-Lanza, 2005). Wolves infection with *Dicrocoelium* can occur by environmental contamination with eggs or by consumption of an infected prey (like ruminant) – considering that our study was conducted in north-west Spain, both possibilities may have occurred. Spirocerosis is characterized by formation of granulomas in the thoracic esophagus and aneurysms and/or mineralized plaques in the aorta (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). *Spirocerca lupi* is a nematode commonly found in dogs in tropical and subtropical zones, but information on the occurrence in wild canids is scarce and fragmentary (Szczesna & Popiolek, 2007). Szafranska *et al.* (2010) refer a 11,5% prevalence but only in reared wolves. Shimalov & Shimalov (2000) prevalence in Belarus was 7,7%, both higher than in our study. Larvae were found in 15,0% (flotation) and 50,0% (sedimentation) of the samples, but it has not been possible to distinguish if they were parasites or free-living Nematoda.

On Table 2 the number of negative, simple, double and triple infections in both coprological methods is presented.

Table 2 – Number of negative, simple, double and triple infections detected by the each coprological method

Method	Flotation (n)	Sedimentation (n)
Negative	46	41
Simple infection	35	33
Double Infection	16	21
Triple Infection	3	5
Total	100	100

In 35,0% (flotation) and 44,0% (sedimentation) of the positive samples, were observed multiple parasites (more than two types of parasites). Unlike Segovia *et al.* (2001), simple infections were the most frequent. These authors found also infections with up to four and five different species (we only identified infections with up to three different parasites), but it should be remembered that their results are from necropsy.

The majority of studies about wolf intestinal helminths are based on necropsy and rarely on coprological methods (Craig & Craig, 2005), hindering the discussion of our results. This may also help to explain the discrepancy found between prevalence in the several studies, as well as the different geographic location, diet, age, proximity to humans, domestic animals and livestock, coprological methods used, among others. We noted that frequencies obtained with both methods differed substantially regarding Ancylostomatidae and Taeniidae, however the aim of this study was not to compare different coprological methods. The methods used are qualitative, not allowing us to quantify the role of wolves in environmental contamination, nevertheless, almost all the eggs found were zoonotic. Human can be exposed to zoonotic helminths through accidental consumption of eggs from the faeces (Jenkins *et al.*, 2011). Thus, according to the results, it is suggested the need for all those working in nature and biodiversity conservation to maintain biosecurity measures, preventing also their own infection.

Acknowledgments

The work was supported by the strategic research Project PEst-OE/AGR/UI0772/2014 financed by the Foundation for Science and Technology.

REFERENCES

- Abdybekova, A.M. & Torgerson, P.R. 2012. Frequency distributions of helminths of wolves in Kazakhstan. *Veterinary Parasitology*, 184: 348-351. DOI:10.1016/j.vetpar.2011.09.004.

- Bagrade, G., Kirjusina, M., Vismanis, M. & Ozolins, J. 2009. Helminth parasites of the wolf *Canis lupus* from Latvia. *Journal of Helminthology*, 83: 63-68. [DOI.10.1017/s0022149x08123860](https://doi.org/10.1017/s0022149x08123860).
- Baños, P. D., Baños, N. D. & Pelayo, M. P. M. 1999. Parasitosis del perro y del gato. Pp: 115-151. In: M.C. Campillo & F.A.R. Vázquez (eds). *Parasitología Veterinaria*. McGraw - Hill - Interamericana, Madrid.
- Barriga, O. O. (ed) 2002. *As enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina*. Editorial Germinal, Santiago Chile. 247pp.
- Barriga, O. O. 2003. *Zoonoses & communicable diseases common to man & animals*. WHO: Scientific and Technical Publication No. 580. 3thEd. 395pp. <<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/711/ZoonosesVol-3.pdf?sequence=1>>. Downloaded on 2 January 2014.
- Cansi, E. R., Bonorino, R., Mustafa, V. S. & Guedes, K. M. R. 2012. Multiple parasitism in wild maned wolf in Central Brazil. *Comp. Clin. Pathol*, 21: 489-493. DOI 10.1007/s00580-012-1513-7.
- Craig, H.L. & Craig, P.S. 2005. Helminth parasites of wolves (*Canis lupus*): a species list and an analysis of published prevalence studies in Nearctic and Palearctic populations. *Journal of Helminthology*, 79: 95-103. [DOI.10.1079/joh2005282](https://doi.org/10.1079/joh2005282).
- Curi, N. H. A., Araújo, A. S., Campos, F. S., Lobato, Z. I. P., Gennari, S. M., Marvulo, M. F. V., Silva, J. C. R. & Talamoni, S. A. 2010. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. *Biodivers Conserv*, 19: 3513-3524. DOI 10.1007/s10531-010-9911-0.
- Di Cerbo, A.R., Manfredi, M.T., Bregoli, M., Milone, N.F. & Cova, M. 2008. Wild carnivores as source of zoonotic helminths in north-eastern Italy. *Helminthologia*, 45, 1:13 - 19. [DOI.10.2478/s11687-008-0002-7](https://doi.org/10.2478/s11687-008-0002-7).
- Dunn, J.J., Columbus, S.T., Aldeen, W.E., Davis, M.E. & Carroll, K.C. 2002. *Trichuris vulpis* Recovered from a Patient with Chronic Diarrhea and Five Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2703-2704. [DOI.10.1128/jcm.40.7.2703-2704.2002](https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2703-2704.2002).

- Eckert, J. & Deplazes, P. 2004. Biological, epidemiological, & clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern [Review]. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 107-135. [DOI.10.1128/cmr.17.1.107-135.2004](https://doi.org/10.1128/cmr.17.1.107-135.2004).
- Foreyt, W. J. (ed) 2001. *Veterinary Parasitology – Reference Manual*. 5th Ed. Blackwell. Malden. 235 pp.
- Guberti, V., Stancampiano, L. & Francisci, F. 1993. Intestinal helminth parasite community in wolves (*Canis lupus*) in Italy. *Parassitologia*, 35: 59-65. [DOI.10.1038/hdy.1993.170](https://doi.org/10.1038/hdy.1993.170).
- Guerra, D., Armua-Fernández, M.T., Silva, M., Bravo, I., Santos, N., Deplazes, P. & Carvalho, L.M.M. 2013. Taeniid species of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in Portugal with special focus on *Echinococcus* spp. *International Journal of Parasitology: Parasites & Wildlife*, 2: 50-53. [DOI.10.1016/j.ijppaw.2012.11.007](https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.007).
- Gutierrez M.P., Ramirez I., Zarzosa M.D., Fernández J.M., Duenas A.I., Mantecon M.A., Almaraz A., Rodríguez-Recio M.J., Marcos H., Alonso P., Bartos M.A., Orduna A., Rodríguez-Torres A. 2003. Seroprevalence of infection due to *Echinococcus granulosus* in the population of Castilla and Leon (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21: 563-567. [DOI.10.1016/s0213-005x\(03\)73010-9](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(03)73010-9).
- Jenkins, E. J., Schurer, J.M., Gesy & K. M. 2011. Old problems on a new playing field: helminth zoonoses transmitted among dogs, wildlife, and people in a changing northern climate. *Veterinary Parasitology*, 182: 54 – 69. [DOI.10.1016/j.vetpar.2011.07.015](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.015).
- Kaufmann, J. (ed) 1996. *Parasitic Infection of Domestic Animals*, Birkhauser Verlag. Basel, Boston, Berlin. 423pp.
- Lavikainen, A., Laaksonen, S., Beckmen, K., Oksanen, A., Isomursu, M. & Meri, S. 2011. Molecular identification of *Taenia* spp. in wolves (*Canis lupus*), brown bears. (*Ursus arctos*) and cervids from North Europe and Alaska. *Parasitology International*, 60: 289-295. [doi:10.1016/j.parint.2011.04.004](https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.04.004).
- Llaneza, L., Herrador, R., Garcia, V. M. & Callejo, A. 2009. Seguimiento estival e invernol de lobos en los ancares lucenses. *Galemys*, 21 (nº especial): 217-231.
- Manga-González, M.Y. & González-Lanza, C. 2005. Field and experimental studies on *Dicrocoelium dendriticum* and dicrocoeliasis in northern Spain. *Journal of Helminthology*, 79: 291-302. DOI: 10.1079/JOH2005323.

- Martinek, K., Kolarova, L., Hapl, E., Literak, I. & Uhrin, M. 2001. Echinococcus multilocularis in European wolves (Canis lupus). *Parasitology Research*, 87: 838-839. [DOI.10.1007/s004360100452](https://doi.org/10.1007/s004360100452).
- Mazaki-Tovi, M., Baneth, G., Aroch, I., Harrus, S., Kass, P.H., Ben-Ari, T., Zur, G., Aizenberg, I., Bark, H. & Lavy, E. 2002. Canine spirocercosis: clinical, diagnostic, pathologic, and epidemiologic characteristics. *Veterinary Parasitology*, 107: 235-250. [DOI.10.1016/s0304-4017\(02\)00118-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00118-8).
- Okulewicz, A., Perec-Matysiak, A., Bunkowska, K. & Hildebrand, J. 2012. Toxocara canis, Toxocara cati and Toxascaris leonina in wild and domestic carnivores. *Helminthologia*, 49: 3 - 10. [DOI.10.2478/s11687-012-0001-6](https://doi.org/10.2478/s11687-012-0001-6).
- Papadopoulos, H., Himonas, C., Papazahariadou, M. & Antoniadou-Sotiriadou, K. 1997. Helminths of foxes and other wild carnivores from rural areas in Greece. *Journal of Helminthology*, 71: 227-231. [DOI.10.1017/s0022149x00015960](https://doi.org/10.1017/s0022149x00015960).
- Popiolek, M., Szczena, J., Nowak, S. & Myslajek, W. 2007. Helminth infections in faecal samples of wolves *Canis lupus* L. from western Beskid Mountains in Southern Poland. *Journal of Helminthology*, 81: 339-344. [DOI.10.1017/s0022149x07821286](https://doi.org/10.1017/s0022149x07821286).
- Robertson, I. D. & Thompson, R. C. 2002. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microbes & Infection*, 4: 391-394. [DOI.10.1016/s1286-4579\(02\)01607-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01607-6).
- Saredi, N. G. (ed). 2002. Manual Prático de Parasitologia Médica. Laboratórios Andrómaco, Buenos Aires, 112pp.
- Segovia, J.M., Torres, J., Miquel, J., Llaneza, L. & Feliu, C. 2001. Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. *Journal of Helminthology*, 75: 183-192. [DOI.10.1079/JOH200152](https://doi.org/10.1079/JOH200152).
- Segovia, J.M., Guerrero, R., Torres, J., Miquel, J. & Feliu, C. 2003. Ecological analyses of the intestinal helminth communities of the wolf, *Canis lupus*, in Spain. *Folia Parasitologica*, 50: 231-236.
- Shimalov, V.V. & Shimalov, V.T. 2000. Helminth fauna of the wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitology Research*, 86: 163-164.
- Sobrino, R., Gonzalez, L. M., Vicente, J., de Luco, D. F., Garate, T. & Gortazar, C. 2006. Echinococcus granulosus (Cestoda, Taeniidae) in the Iberian wolf. *Parasitology Research*, 99(6): 753-756. [DOI.10.1007/s00436-006-0229-5](https://doi.org/10.1007/s00436-006-0229-5).
- Szafranska, E., Wasielewski, O. & Bereszynski, A. 2010. A faecal analysis of helminth infections in wild and captive wolves, *Canis lupus* L., in Poland. *Journal of Helminthology*, 84: 415-419. [DOI.10.1017/s0022149x10000106](https://doi.org/10.1017/s0022149x10000106).

- Szczesna, J. & Popiolek, M. 2007. The first record of *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809) from Poland based on faecal analysis of wolf (*Canis lupus* L.). *Helminthologia*, 44, 4: 30 – 232. DOI.10.2478/s11687-007-0038-0.
- Torres, J., Segovia, J.M., Miquel, J., Feliu, C., Llana, L. & Petrucci-Fonseca, F. 2000. Helminthofauna del lobo ibérico (*Canis lupus signatus* CABRERA, 1907). Aspectos potencialmente útiles en mastozoología. *Galemys*, 12 (nºespecial): 1-11
- Torres, J., Pérez, M.J., Segovia, J.M. & Miquel, J. 2001. Utilidad de la coprologia parasitaria en la detección de helmintos parásitos en los cánidos silvestres ibéricos. *Galemys*, 13 (nº especial): 75-83.

Capítulo VI

***Echinococcus granulosus* em gineta (*Genetta genetta*)**

Na sequência do trabalho desenvolvido neste capítulo foram apresentadas as seguintes comunicações em congressos nacionais e internacionais:

- Mateus, T. L., Barrocas, C. (2012). Wild carnivores as a source of zoonotic helminths in the northern Portugal. Joint 61st Wildlife Disease Association/10th Biennial European Wildlife Disease Association Conference. 23 – 27 July 2012. Lyon. France (comunicação em painel).
- Mateus, T. L., Barrocas, C. (2012). Diversidade e prevalência de helmintes intestinais encontrados em fezes de *Genetta genetta* numa área protegida do norte de Portugal – dados preliminares. IV Congresso da Fauna Selvagem WAVES Portugal. 28 – 29 Setembro 2012. Bragança. Portugal (comunicação oral).

Foi ainda realizado um manuscrito para submissão:

“Prevalência e diversidade de helmintes intestinais em ginetas (*Genetta genetta*) numa área protegida do norte de Portugal”

Prevalência e diversidade de helmintes intestinais em fezes de gineta (*Genetta genetta*) numa área protegida do norte de Portugal

Authors: A. Castro¹, J. N. Ribeiro^{2,3}, M. M. Vieira-Pinto⁴, T. L. Mateus^{2,3,4,5}

¹ ICETA/CECA, University of Porto, Public Health Centre Dr. Gonçalves Ferreira, National Institute of Health, Rua Alexandre Herculano, 321, 4000-055 Porto, Portugal;

² Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal;

³ EpiUnit, Epidemiology Research Unit, Institute of Public Health of the University of Porto, Rua das Taipas, nº 135, 4050-600 Porto, Portugal;

⁴ Animal and Veterinary Research Centre, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Quinta dos Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal;

⁵ Ponte de Lima Agrarian School, Viana do Castelo Polytechnic Institute, Portugal, Portugal;

RESUMO

A Paisagem Protegida das Lagoas de Bertandós e S. Pedro d'Arcos localiza-se no Alto Minho, Portugal, sendo a única zona húmida classificada no Norte de Portugal. A gineta europeia (*Genetta genetta*) é um dos habitantes desta área. Apesar de o estado de conservação estar classificado pela União Internacional para a Conservação da Natureza como pouco preocupante, a presença de ginetas num habitat está positivamente relacionada com a abundância de outros carnívoros silvestres. O objectivo deste estudo é contribuir para o conhecimento da prevalência e diversidade de helmintes intestinais nestes carnívoros silvestres. Para o efeito, entre Junho de 2011 e Junho de 2012 recolheram-se nesta área 60 amostras de fezes de gineta, e foram realizadas análises coprológicas qualitativas (Método de Willis). Foram encontradas formas parasitárias em 28 amostras (46,7%), nomeadamente ovos *Toxocara* (17 amostras, 60,7%), Ancylostomatidae (13 amostras, 46,4%), *Trichuris* (uma amostra, 3,5%) e Taeniidae (uma amostra, 3,5%). Existe uma elevada frequência de amostras positivas neste estudo, e todas as formas parasitárias encontradas são zoonóticas. Esta área protegida é

atravessada por inúmeros trilhos que são diariamente percorridos por pessoas. A natureza zoonótica dos parasitas encontrados sugere a necessidade de implementar medidas preventivas de contaminação ambiental acompanhadas de campanhas de educação para a saúde da comunidade.

1. Introdução

A Paisagem Protegida das Lagoas de Bertandos e S. Pedro d'Arcos localiza-se no Concelho de Ponte de Lima, Portugal, onde um conjunto de factores biogeográficos interagem para criar um ambiente único que fazem dela a única zona húmida classificada no Norte de Portugal. A fauna vertebrada da área é extraordinária na sua diversidade, com nove espécies de peixes, 13 espécies de anfíbios, 11 de répteis, 41 de mamíferos e 144 de aves registadas até hoje (Alonso et al., 2010). A gineta europeia (*Genetta genetta*) é um dos habitantes desta área. Apesar de, em termos de conservação, estar classificada pela União Internacional para a Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature*, IUCN) como *least concern*, pouco preocupante (IUCN, 2014), a presença de ginetas num habitat está positivamente relacionada com a abundância de outros carnívoros silvestres (Galantinho and Mira, 2009), pelo que interessa saber que helmintes intestinais, com especial atenção a *Echinococcus granulosus*, infectam as ginetas, que possam ser transmitidos a outros animais – silvestres, domésticos e até mesmo ao Homem – pela via, por exemplo, da contaminação ambiental. O objectivo deste estudo é contribuir para o conhecimento da prevalência e diversidade de parasitas helmintes intestinais nestes carnívoros silvestres, com especial ênfase para *Echinococcus granulosus*.

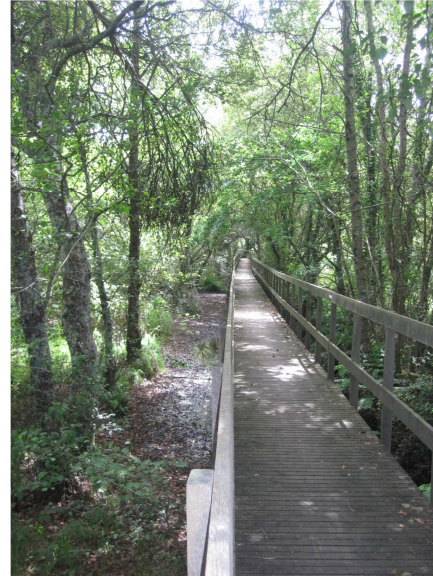
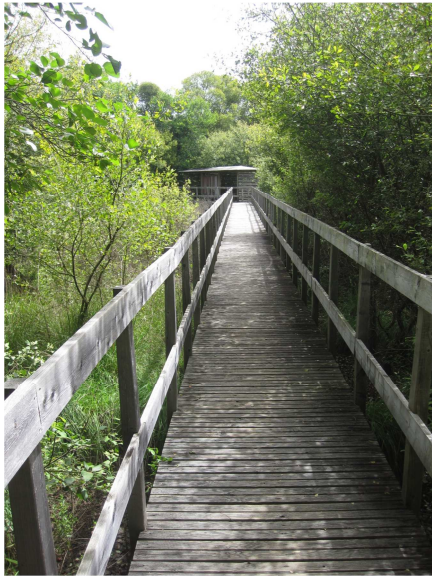
2. Material e Métodos

Entre Junho de 2011 e Junho de 2012 recolheram-se na Paisagem Protegida das Lagoas de Bertandos e S. Pedro d'Arcos, 60 amostras de fezes de gineta. As amostras foram devidamente colocadas em recipientes plásticos individuais, rotuladas e armazenadas em refrigeração até serem processadas (o que aconteceu num intervalo de tempo nunca superior a 48h). Posteriormente foi realizada a análise coprológica qualitativa de flutuação - Método de Willis – de acordo com o já descrito (Foreyt, 2001). A identificação dos ovos foi feita com base em características morfológicas e de tamanho (Foreyt, 2001, Bowman et al., 2004, Zajac & Conboy, 2012).

3. Resultados e Discussão

Foram encontradas formas parasitárias em 28 amostras (46,7%), nomeadamente ovos de *Toxocara* (17 amostras, 60,7%), da família Ancylostomatidae (13 amostras, 46,4%), do género *Trichuris* (uma amostra, 3,5%) e da família Taeniidae (uma amostra, 3,5%), sendo que quatro amostras tinham infecções duplas. Não foi possível fazer análise de biologia molecular à única amostra com ovos Taeniidae uma vez que a quantidade de amostras recolhida era pequena e foi usada na totalidade na coprologia de flutuação realizada.

Existe uma elevada frequência de amostras positivas neste estudo, o que por um lado revela o grau de parasitismo destes animais, por outro, e fruto da contaminação ambiental resultante, alerta para a disseminação destes agentes para outros carnívoros silvestres, uma vez que estes serão co-habitantes da mesma área. A contaminação ambiental poderá também levar à infecção de outros animais que não carnívoros (nomeadamente ungulados) e até que não silvestres, mas domésticos. Os animais silvestres podem ter grande importância enquanto reservatórios e perpetuadores da transmissão da doença, sendo fonte de infecção quer para animais domésticos quer para o Homem (Jenkins et al., 2005). Poderá também a transmissão estar a ser feita no sentido contrário como sugerido por (Otero-Abad & Torgerson, 2013), isto é, dos ungulados domésticos para os carnívoros silvestres. Na Área Protegida das Lagoas, além de existirem animais domésticos na quinta pedagógica, circulam vários outros – ruminantes em pastoreio e carnívoros domésticos. Acresce que todas as formas parasitárias encontradas são zoonóticas. Os parasitas *Toxocara* e Ancylostomatidae, encontrados com maior frequência, causam os síndromes da *Larva Migrans Visceral* e *Cutanea* respectivamente, no Homem (Taylor et al., 2007). Em meios rurais, os carnívoros silvestres são descritos como potenciais reservatórios e amplificadores da infecção por *Toxocara* (Chomel, 2008). Não foi possível saber se o ovo Taeniidae seria ou não de *Echinococcus*, mas *Echinococcus granulosus* já foi identificado nestes carnívoros silvestres (Lahmar et al., 2009), e algumas espécies do género *Taenia* também são zoonóticas. Esta área protegida é atravessada por inúmeros trilhos que são diariamente percorridos por pessoas, muitas vezes em família, com crianças, que são um grupo de risco. Uma grande parte destes trilhos é realizada em passadiços de madeira elevados sobre as lagoas (Figuras 1), pelo que pelo menos nestes, a co-existência de animais domésticos, selvagens e o Homem acontece.



Figuras 1 – Passadiços de madeira na Área Protegida das Lagoas (Originais)

Será ainda importante referir que é nos tectos dos abrigos de madeira usados pelo Homem para observar aves e outras espécies, que muitos dos animais silvestres desta Área Protegida gostam de defecar (Figura 2).



Figura 2 – Dejectos de carnívoros silvestre no tecto de abrigo (Original)

Com a chuva, o vento e com a ajuda de outros animais que servem como vectores mecânicos (Moro & Schantz, 2009, Deplazes et al., 2011), estas fezes e respectivas formas parasitárias aí eventualmente presentes podem escorrer contaminando com muita facilidade os locais onde o Homem se movimenta. Acresce que esta é uma zona húmida, e as baixas temperaturas associadas a locais de elevada pluviosidade permitem prolongar a viabilidade dos ovos no ambiente (Otero-Abad & Torgerson, 2013).

Os hospedeiros silvestres representam um importante reservatório para a potencial transmissão de *Echinococcus granulosus* particularmente em áreas onde existe sobreposição entre o habitat destes animais e dos humanos (Jenkins & Macpherson, 2003), constituindo esta sobreposição um dos principais factores para a emergência ou re-emergência de diversas zoonoses parasitárias (Chomel, 2008).

A natureza zoonótica dos parasitas encontrados sugere a necessidade de implementar medidas preventivas de contaminação ambiental acompanhadas de campanhas de educação para a saúde da comunidade, sobretudo tendo em conta que se trata duma área muito frequentada por crianças.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos técnicos ambientais da Área Protegida das Lagoas de Bertandos e S. Pedro D'Arcos a preciosa ajuda na recolha de amostras. Este trabalho foi apoiado pelo Projecto PEst-OE/AGR/UI0772/2014 financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

Referências:

- ALONSO, J. M., PEREIRA, S., RODRIGUES, G. & VIEIRA, O. S. 2010. *Área de Paisagem Protegida das Lagoas de Bertandos e S. Pedro D'Arcos uma Escola de Ambiente Natureza e Mundo Rural*, Município de Ponte de Lima.
- BOWMAN, D. D., LYNN, R. C. & EBERHARD, M. L. 2004. *Georgis Parasitologia para Veterinários*, Elsevier.
- CHOMEL, B. B. 2008. Control and prevention of emerging parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 38, 1211-1217.
- DEPLAZES, P., VAN KNAPEN, F., SCHWEIGER, A. & OVERGAAUW, P. A. M. 2011. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Veterinary Parasitology*, 182, 41-53.
- FOREYT, W. J. 2001. *Veterinary Parasitology*, Blackwell Publishing.
- GALANTINHO, A. & MIRA, A. 2009. The influence of human, livestock, and ecological features on the occurrence of genet (*Genetta genetta*): a case study on Mediterranean farmland. *Ecological Research*, 24, 671-685.

- IUCN 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. . International Union for Conservation of Nature.
- JENKINS, D. J. & MACPHERSON, C. N. 2003. Transmission ecology of *Echinococcus* in wild-life in Australia and Africa. *Parasitology*, 127 Suppl, S63-72.
- JENKINS, D. J., ROMIG, T. & THOMPSON, R. C. A. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.- a global update. *International Journal for Parasitology*, 35, 1205-1219.
- LAHMAR, S., BOUFANA, B. S., INOUBLI, S., GUADRAOUI, M., DHIBI, M., BRADSHAW, H. & CRAIG, P. S. 2009. *Echinococcus* in the wild carnivores and stray dogs of northern Tunisia: the results of a pilot survey. *Ann Trop Med Parasitol*, 103, 323-31.
- MORO, P. & SCHANTZ, P. M. 2009. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis*, 13, 125-33.
- OTERO-ABAD, B. & TORGERSON, P. R. 2013. A systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2249.
- TAYLOR, M. A., COOP, R. L. & WALL, R. L. 2007. *Veterinary Parasitology*, Wiley Blackwell Publishing.
- ZAJAC, A. M. & CONBOY, G. A. 2012. *Veterinary Clinical Parasitology*, Wiley Blackwell.

Capítulo VII

Recolha e análise de LCH em hospedeiro intermediário doméstico e silvestre

Na sequência do trabalho desenvolvido neste capítulo foram apresentadas as seguintes comunicações em congressos nacionais e internacionais:

- Mateus, T., Ribeiro, J. N., Castro, A., Vieira-Pinto, M. M. (2012). Diagnóstico visual da hidatidose na inspecção sanitária: será inequívoco? XVI Congresso Português de Parasitologia. Sociedade Portuguesa de Parasitologia. FMV-UTL. 29 – 30 Novembro 2012. Lisboa, Portugal (comunicação oral).

- Mateus, T. L., Coelho, C., Castro, A., Cardoso, M., Vieira-Pinto, M. M. (2012). The same look but different consequences – hydatid and cysticercus diseases in wild boars. Joint 61st Wildlife Disease Association/10th Biennial European Wildlife Disease Association Conference. 23 – 27 July 2012. Lyon. France (comunicação em painel).

Foi ainda publicado um artigo em revista nacional com arbitragem científica:

- Mateus, T., Ribeiro, J. N., Castro, A., Vieira-Pinto, M. M. (2012). Diagnóstico visual da hidatidose na inspecção sanitária: será inequívoco? Acta Parasitológica Portuguesa. Vol. 19 (1/2): 39 – 42. ISSN 0872-5292 (Anexo III).

Finalmente, foi ainda submetido um manuscrito à revista Food Control:

“Challenges to the diagnosis of ruminants’ hydatidosis during meat inspection and its importance for disease control”

Capítulo VIII

Genótipos de quistos hidáticos identificados em animais em Portugal

Na sequência do trabalho desenvolvido neste capítulo foram apresentadas as seguintes comunicações em congressos internacionais:

-Vieira-Pinto, M.M., Mateus, T., Gargaté, M.J., Vilares, A., Ferreira, I., Coelho, C., Rodrigues, M. (2011). First identification of *Echinococcus orteppi* in free living wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. VI International Symposium on Wild Fauna. Edinburgh. UK (comunicação em painel).

- Mateus, T. L., Ribeiro, J.N., Vieira-Pinto, M.M., Cardoso, M., Castro, A. (2012). Hydatid cyst genotyping (preliminar data) – laboratory contribution to epidemiosurveillance and disease prevention. II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental (XII International Symposium on Experimental Techniques). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 10 - 12 Dezembro 2012. Coimbra, Portugal (comunicação oral).

Um resumo desta comunicação foi também publicado em revista internacional com arbitragem científica:

- Mateus, T. L., Ribeiro, J.N., Vieira-Pinto, M.M., Cardoso, M., Castro, A. (2012). Hydatid cyst genotyping (preliminar data) – laboratory contribution to epidemiosurveillance and disease prevention. *Experimental Pathology and Health Sciences*, 6 (1): 57. ISSN 1646-8422.

Foi ainda realizado um Manuscrito para submissão:

“Evaluation of *Echinococcus granulosus* genotypes from Portuguese intermediate hosts using the ribosomal NADH dehydrogenase fragment”

Evaluation of *Echinococcus granulosus* genotypes from Portuguese intermediate hosts using the NADH dehydrogenase fragment

Authors: A. Castro¹, F. Lina¹, I. M. H. Costa², J. N. Ribeiro^{3,4}, M. A. P. Conceição², M. M. Vieira-Pinto⁵, T. L. Mateus^{3,4,5,6}

¹ ICETA/CECA, University of Porto, Public Health Centre Dr. Gonçalves Ferreira, National Institute of Health, Rua Alexandre Herculano, 321, 4000-055 Porto, Portugal;

² Coimbra Agrarian School, Coimbra Polytechnic Institute, Bencanta, 3040-316 Coimbra, Portugal;

³ Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal;

⁴ EpiUnit, Epidemiology Research Unit, Institute of Public Health of the University of Porto, Rua das Taipas, nº 135, 4050-600 Porto, Portugal;

⁵ Animal and Veterinary Research Centre, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Quinta dos Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal;

⁶ Veterinary Medicine Department, Vasco da Gama University School, Av. José R. Sousa Fernandes, Campus Universitário—Bloco B, Lordemão, 3020-210 Coimbra, Portugal

Abstract

The knowledge about *Echinococcus granulosus* cycle and epidemiology in Portugal is limited mainly concerning the genotypes existent and their specificity towards hosts. In order to ascertain the lack of information *Echinococcus granulosus* samples were independently collected from different regions and hosts in Portugal and treated in order to evaluate their genetic variability using for that purpose the amplification and sequencing of a NADH dehydrogenase I fragment (NAD) as previously described. The results of the analysis of the 50 samples collected indicate the presence of genotypes G1, G2 and G7, as well as several polymorphisms within each genotype and within the same host. The results obtained suggest a far more complicated dynamics in *Echinococcus*

granulosus cycle than initially expected including the existence of subpopulations that may infect preferentially some type of hosts, mostly in the case of cattle.

Keywords: Zoonosis, *Echinococcus granulosus*, NADH dehydrogenase, genotypes

1. Introduction

Parasitic zoonoses are a particular source of concern, since they pose an important risk for public health and also have a relevant socioeconomic impact. Hidatidosis is an important zoonosis in the Mediterranean region (Eckert & Deplazes, 2004, Sadjadi, 2006), the most affected region in Europe (Jenkins et al., 2005). Hydatidosis is one of the five most frequent zoonosis in this area (Dakkak, 2010).

Portugal is considered by the World Health Organization as an endemic country (Eckert et al., 2001). In a 25 years period (1979-2003), (David de Morais, 1998, David de Morais, 2007, David de Morais, 2010) presented the Évora region as yielding a mean incidence of 12.2 cases/100,000 inhabitants/year. The same author (David de Morais, 2010) referred the centre of Portugal as being the second most affected region concerning to the number of human cases in official statistics (9.2%) and the third in his personal clinical data (6.2%).

Hydatidosis is commonly detected at slaughterhouses but nonetheless the lack of accurate registry of these cases doesn't allow a clear picture on the presence and dispersion of the parasite in Portugal. Besides the lack of information on the presence and distribution of the parasite, few studies have been performed about the genetic diversity of the *Echinococcus granulosus* in Portugal (Beato et al., 2013). The genetic variability within *Echinococcus granulosus* populations has important implications regarding epidemiology. Several *Echinococcus granulosus* genotypes have been described based in genetic differentiation and reflecting variability in their phenotypes, affecting the host specificity, pathogenicity and transmission dynamics. The genotypes have implications in the implementation and efficiency of the control programs (Eckert & Deplazes, 2004). Despite this, very little information is yet available about

geographic dispersion, animal and human prevalence and hosts diversity of the different strains (Rojas et al., 2014).

Some DNA fragments from ribosomal DNA have been used to define *Echinococcus granulosus* genotypes, namely cytochrome oxidase I, NADH dehydrogenase I and ITS1 (Bowles et al., 1992, Bowles & McManus, 1993a, Bowles & McManus, 1993b). Several authors refer that results from those sequences are complementary and any one of those fragments may be used to evaluate *Echinococcus granulosus* genotypes.

The knowledge on *Echinococcus granulosus* epidemiology in Portugal is limited mainly concerning the genotypes existent and their specificity towards hosts. In order to ascertain this lack of information we proceeded to the collection of *Echinococcus granulosus* cysts samples in Portugal and to their respective genotypic characterization.

2. Material and methods

2.1 Strain and plasmid

Escherichia coli XL1 Blue (Stratagene) strain was used to sub-clone pGEM-T Easy (Promega) vector.

Plasmid DNA was purified from bacterial cultures using the *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) kit. Bacterial cultures were grown at 37 °C, overnight, following manufacturer instructions.

2.2 Collection of *Echinococcus granulosus* cysts samples

The *Echinococcus granulosus* cysts from cattle, sheep and pigs were collected in slaughterhouses in the north and centre of Portugal. Some samples from the centre region (pig and sheep cysts) were collected in situ in local farms that performed home-slaughtering. Wild boar and wild cervid samples were collected at organized hunting campaigns. Although samples were collected in the north and centre of Portugal, the animal origin was from all over the country.

2.3 Molecular detection of *Echinococcus granulosus*

For extraction of total DNA we used the QIAamp ADN Mini Kit (Qiagen) according to protocol provided by the manufacturer for the purification of DNA from tissues. The presence of *Echinococcus granulosus* DNA was evaluated by PCR using the amplification of a NADH dehydrogenase 1 fragment (Bowles et al., 1992). PCR products were submitted to a purification step with the *illustra™ GFX PCR DNA & Gel Band Purification* kit (GE, Healthcare), following manufacturer instructions.

2.4 pGEM-T Easy vector subcloning

The ligation reaction of PCR products or enzymatic digestions products to pGEM vector was carried out with a mix consisting of 3 µL of DNA sample, 1 µL of pGEM-T Easy (Promega), 5 µL of ligase buffer 2x (Promega) and 1 µL of T4 DNA ligase enzyme (Promega), up to a final volume of 10 µL. The ligation reaction occurred at room temperature overnight or at 37 °C during 1 hour and 30 minutes. *E. coli XL1 Blue* cells were transformed with the resulting pGEM-T Easy vector ligations. *E. coli* cells were plated onto LB agar containing ampicilin, X-Gal and IPTG and incubated overnight at 37 °C. White colonies were transferred to liquid cultures of LB containing ampicilin and then, we carried out the plasmid DNA extraction protocol (Promega minipreps).

Clones verification was done by an enzymatic digestion with EcoRI enzyme (Promega), consisting of 7 µL of selected clones, 2 µL of Buffer H 10x and 1 µL of EcoRI enzyme, up to a final volume of 10 µL. Enzymatic digestion occurred during 2 to 3 hours at 37 °C and the resulting digested DNA was observed on agarose gels with an appropriated percentage.

2.5 Sequencing

All the DNA constructions made in this study on pGEM were sequenced at *Eurofins MWG Operon* (Germany).

2.6 Data analysis

Sequences were analysed using BLAST tools and NCBI DNA sequences database.

3. Results

Samples of *Echinococcus granulosus* from different regions and hosts were collected independently and treated in order to evaluate their genetic variability using for that purpose the amplification and sequencing of a NADH dehydrogenase I fragment (NAD) as previously described (Bowles *et al.*, 1992, Bowles & McManus, 1992).

We were able to collect samples from the more relevant hosts regarding their veterinary relevance (Table 1). In most of the cases the data available from the slaughterhouse, or directly from the farmers indicate that the hosts (except wild boar and the cervid) spent their lifetime in a Portuguese region.

Table 1 - Number of samples collected from the different hosts.

Host	Number of samples
Sheep	22
Cattle	7
Pig	19
Wild Boar	1
Cervid	1

Most of the hydatid cysts were identified macroscopically as *Echinococcus granulosus*, nonetheless in some pig and sheep samples that identification was doubtful (mainly in the presence of small cysts) and only possible through PCR. When possible we used for the extraction of DNA the protoscoleces (Table 2). In samples without protoscoleces a fragment of the internal layer was used to prepare *Echinococcus granulosus* DNA.

Table 2 - Parasitic tissue used for the preparation of total *Echinococcus granulosus* DNA

Host	Parasitic tissue	Number of samples
Sheep	Protoscoleces	22
	Internal layer	0
Cattle	Protoscoleces	4
	Internal layer	3
Pig	Protoscoleces	7
	Internal layer	12
Wild boar	Protoscoleces	1
	Internal layer	0
Wild cervid	Protoscoleces	1
	Internal layer	0

Upon PCR for amplification of NADH, the fragment was subcloned and sequenced for further analysis. Sequences were analysed using NCBI database in order to determine the genotype and the existence of polymorphisms (Table 3).

Table 3 - Analysis of sequences obtained by sequencing of *Echinococcus granulosus* NADH fragments PCR products

Host	Samples genotype	Number of samples	Sequence reference	Polymorphisms
Sheep	G1	22	AF297617	9 samples with 100% homology 13 samples with polymorphisms
Pig	G7	19	AJ241217	19 samples with polymorphisms
Cattle	G1	4	DQ168026	4 samples with polymorphisms
	G2	3	DQ080021	3 samples with polymorphisms
Wild boar	G7	1	AJ241217	1 sample with polymorphism
Cervid	G1	1	DQ168026	1 sample with polymorphism

The results of the analysis of the 50 samples indicate the presence of genotypes G1, G2 and G7, as well as several polymorphisms within each genotype and within the same host.

Regarding sheep samples, the analysis shows that all the 22 *Echinococcus granulosus* are genotype G1. All these samples showed the higher level of homology with the reference sequence AF297617 (and nine of these samples have 100% homology with it). The polymorphisms detected in the 13 remaining samples are scattered in the full length of the sequence and none of the polymorphism is repeated among those samples.

As for the pig samples, as well as the one from the wild boar, analysis showed homology with NADH sequence of G7 strain (AJ241217). All samples present a polymorphism at position 34 (T to C) suggesting the existence of a feature common to all samples of *Echinococcus granulosus* collected so far from pig host. In further analysis of NADH G7 strain sequences available at NCBI databases none of the sequences had the same feature, suggesting the existence of a specific signature for *Echinococcus granulosus* G7 strain present in Portugal. Beside the described feature, several other polymorphism were detected although none of them was present in more than one sample.

Samples from cattle can be gathered in two groups. One first group with higher homology with an *Echinococcus granulosus* sample of G1 genotype (DQ168026) described by Battacharya et al. (2007) found in cattle from India. A second group containing samples with main homology with an *Echinococcus granulosus* genotype G2 (DQ080021) described by the same authors from a buffalo sample, also from India. The G1 sequence detected in cattle showed a significant genetic difference from those detected in sheep samples.

The sample from the cervid also presented higher homology with *Echinococcus granulosus* sample of G1 genotype (DQ168026).

4. Discussion

The current study main purpose was to evaluate the existence of genetic variability in *Echinococcus granulosus* (hydatid cysts) collected in Portugal. For

that purpose we performed a systematic gathering of *Echinococcus granulosus* from different hosts including those with higher value in farming (sheep, cattle and pigs) and in wildlife.

In the current study we expected to obtain data that could clarify the *Echinococcus granulosus* cycle dynamics in Portugal. For that purpose a defined *Echinococcus granulosus* fragment, the NADH dehydrogenase I fragment, was used as reference.

So far we observed the existence of G1, G2 and G7 strains in Portugal. For each type of host we detected a certain set of strain and genetic diversity common to that specie. We have not been able to demonstrate the existence of the same genetic fragment in different hosts. This observation can easily be explained due to the low number of samples analysed for each species and by the fact that the hosts came from different geographic areas. Nonetheless some facts are worth emphasize, namely that in pigs, only G7 strain was found although the majority of these samples come from areas where sheep hidatidosis has also been detected. Several reports including studies performed in neighbouring Spain refer the presence of G1 and G7 strain in pigs (Gonzalez et al., 2002). So far the presence of G1 in pigs has not been observed, with its implication regarding public health, since the G1 strain is responsible for the majority of human hidatidosis cases. A striking feature of all *Echinococcus granulosus* pigs samples studied is the existence of a specific base mutation (when compared with G7 sequences present in NCBI database) common to all of them.

Regarding samples from sheep and cattle we identified the presence of genotypes G1/G2 commonly observed in sheep. Both genotypes have been previously detected in the centre region of Portugal (Beato et al., 2010). Although these genotypes are mainly present in sheep they can occur in other species as for instance in cattle. Nevertheless the data obtained suggest the existence of two G1 populations, a G1 population with higher homology with G1 reference sequence AF297617, detect in sheep host, and a second G1 population detected in cattle with homology with the reference sequence DQ168026, suggesting a segmentation of these population dynamics and an eventual increased susceptibility of cattle to that *Echinococcus granulosus* G1 population.

The G1 and G2 sequences (DQ168026 and DQ080021) found in cattle and buffalo have been described in samples from India (Bhattacharya et al., 2007)

what is not that surprising considering the maritime route and intensive trade developed by Portuguese in India since the XVI century that could lead to the dispersion of these *Echinococcus granulosus* strains (David de Moraes, 1998).

For our knowledge, it is the first identification of genotypes in both wildlife intermediary hosts – wild boar (G7) and cervid (G1).

The results obtained suggest a far more complicated dynamic in *Echinococcus granulosus* cycle than initially expected, including the existence of subpopulations that may infect preferentially some type of hosts, mostly in the case of cattle. Further data is needed to understand the dynamics and extension of *Echinococcus granulosus* cycle in Portugal.

Acknowledgments

The authors thank the Farmers Health Organization (OPP) of Tocha, Cantanhede and Vinhais. The work was supported by the strategic research Project PEst-OE/AGR/UI0772/2014 financed by the Foundation for Science and Technology (FCT).

References

- BEATO, S., PARREIRA, R., CALADO, M. & GRACIO, M. A. A. 2010. Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal. *Parasitology International*, 59, 638-642.
- BEATO, S., PARREIRA, R., ROQUE, C., GONCALVES, M., SILVA, L., MAURELLI, M. P., CRINGOLI, G. & GRACIO, M. A. 2013. *Echinococcus granulosus* in Portugal: The first report of the G7 genotype in cattle. *Veterinary Parasitology*, 198, 235-239.
- BHATTACHARYA, D., BERA, A. K., BERA, B. C., MAITY, A. & DAS, S. K. 2007. Genotypic characterisation of Indian cattle, buffalo and sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. *Veterinary Parasitology*, 143, 371-374.

- BOWLES, J., BLAIR, D. & MCMANUS, D. P. 1992. GENETIC-VARIANTS WITHIN THE GENUS ECHINOCOCCUS IDENTIFIED BY MITOCHONDRIAL-DNA SEQUENCING. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54, 165-174.
- BOWLES, J. & MCMANUS, D. P. 1993a. Molecular variation in Echinococcus. *Acta Tropica*, 53, 291-305.
- BOWLES, J. & MCMANUS, D. P. 1993b. NADH DEHYDROGENASE-1 GENE-SEQUENCES COMPARED FOR SPECIES AND STRAINS OF THE GENUS ECHINOCOCCUS. *International Journal for Parasitology*, 23, 969-972.
- DAKKAK, A. 2010. Echinococcosis/hydatidosis: A severe threat in Mediterranean countries. *Veterinary Parasitology*, 174, 2-11.
- DAVID DE MORAIS, J. A. 1998. *A hidatidologia em Portugal*, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- DAVID DE MORAIS, J. A. 2007. Hidatidose humana - estudo clínico-epidemiológico no distrito de Évora durante um quarto de século. *Acta Médica Portuguesa*, 20, 1-10.
- DAVID DE MORAIS, J. A. 2010. Progressão e declínio da hidatidose humana em Portugal: análise histórico-epidemiológica. *Medicina Interna*, 17, 274-285.
- ECKERT, J. & DEPLAZES, P. 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 107-+.
- ECKERT, J., GEMMELL, M. A., MESLIN, F.-X. & PAWŁOWSKI, Z. S. 2001. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*.
- GONZALEZ, L. M., DANIEL-MWAMBETE, K., MONTERO, E., ROSENZVIT, M. C., MCMANUS, D. P., GARATE, T. & CUESTA-BANDERA, C. 2002. Further molecular discrimination of Spanish strains of Echinococcus granulosus. *Experimental Parasitology*, 102, 46-56.
- JENKINS, D. J., ROMIG, T. & THOMPSON, R. C. A. 2005. Emergence/re-emergence of Echinococcus spp.- a global update. *International Journal for Parasitology*, 35, 1205-1219.
- ROJAS, C. A. A., ROMIG, T. & LIGHTOWLERS, M. W. 2014. Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans - review of current knowledge. *International Journal for Parasitology*, 44, 9-18.
- SADJADI, S. M. 2006. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitology International*, 55, S197-S202.

Capítulo IX

Discussão

Os agentes zoonóticos constituem 868 de um total de 1415 espécies de agentes infecciosos reconhecidamente patogénicos para o Homem (Taylor et al., 2001).

A hidatidose é uma doença de interesse crescente na saúde pública, sendo vista como emergente ou reemergente (Jenkins et al., 2005). Existe mesmo o receio de que a hidatidose se tenha tornado hiperendémica em áreas onde foi anteriormente endémica (Moro & Schantz, 2009).

No Homem, trata-se duma doença muito antiga, já que terá sido descrita pela primeira vez por Hipócrates como um “quisto cheio de água” num fígado de um humano, e por Aristóteles, no pulmão e fígado (Sotiraki et al., 2003). Contudo, e apesar de todos os esforços que tem sido feitos, poucos foram os países capazes de erradicar esta doença (McManus et al., 2003, Carig et al., 2007). Em Portugal, aparentemente, a incidência está em declínio, contudo, o envelhecimento da população e o aumento dos indivíduos imunodeprimidos (com doenças crónicas: oncológicas, cardiovasculares, alergénicas, diabéticas, entre outras) enfatizam a necessidade de um maior reconhecimento das doenças zoonóticas (Wiedmann, 2003, Dorny et al., 2009).

A hidatidose humana ocorre predominantemente em comunidades rurais, de criação de ruminantes, e que mantém cães pastores (Craig et al., 2007, Carmena et al., 2008). Assim, os criadores de ovinos e caprinos inquiridos no nosso estudo constituem um grupo de risco, que assume realizar práticas de risco, não manter protocolos básicos de higiene animal e finalmente desconhecer quase totalmente a doença. Os criadores inclusivamente parecem coleccionar práticas de risco, já que existe associação estatisticamente significativa entre algumas delas. O facto de 69% dos criadores terem assumido realizar abate doméstico, faz-nos suspeitar que esta percentagem poderá ser ainda maior – e não assumida. O abate doméstico de animais é uma prática cultural antiga em ambiente rural português, muitas vezes associada a festividades e por isso um hábito de difícil mudança, se não for perfeitamente entendido o risco que pode representar para e por quem o pratica (Correa-Prisant, 1999). As razões que justificam o abate de animais para consumo humano em matadouro, e não fora dele, são diversas, nomeadamente, cumprimento de normas básicas de bem-estar animal, mas também um destino higiénico para os despojos resultantes do abate, e sobretudo uma correcta e profissional inspecção sanitária. Os quistos hidáticos podem ser muito pequenos

e difíceis de identificar e/ou distinguir de outras lesões, como se evidenciou no Capítulo VII. Não é por isso estranho que apenas 3% dos criadores tenham referido já terem visto quistos hidáticos nas vísceras. Enterrar as vísceras não é seguramente a melhor prática sanitária. Em meio rural, o que acontece frequentemente às vísceras enterradas, segundo nos foi relatado por alguns criadores e sobretudo por caçadores, é que são desenterradas por carnívoros quer domésticos quer silvestres, permitindo que se complete o ciclo biológico da doença, se o quisto estiver presente. Assim, efectivamente, mais de três quartos dos criadores referiu manter práticas que perpetuam a doença. Acresce que as práticas de desparasitação do cão poderão não ser as mais correctas, à semelhança do que já foi descrito por Bruzinskaite et al. (2009). Muitos dos criadores não desparasitam os cães, e isso parece ter sido comprovado pelos resultados da coprologia quer aos cães destes criadores, quer aos cães do Concelho. Dos que afirmam desparasitar, fazem-no maioritariamente uma vez por ano. Ora, aquilo que é sugerido é que a desparasitação aconteça pelo menos de seis em seis semanas (Moro & Schantz, 2006). Para que esta seja efectiva, terá que conter praziquantel ou epsiprantel (DeWolf et al., 2012), mas uma parte significativa dos criadores que afirmaram desparasitar, não souberam dizer que fármaco usavam para a desparasitação. Estes são cães que contactam com outros cães e outros animais, promovendo assim a disseminação destes e de outros agentes biológicos, nomeadamente zoonóticos, como verificamos no Capítulo IV. O facto de termos identificado nos métodos coprológicos formas parasitárias de parasitas de outras espécies que não o cão (identificamos ovos de parasitas de ruminantes, de aves, de roedores, entre outros) de certa forma é demonstrativo da promiscuidade que é vivida entre estes animais, e da falta de higiene (Figuras 9.1 e 9.2).



Figura 9.1 – Fotografia obtida aquando da realização da recolha de amostras
(Original)



Figura 9.2. – Fotografia obtida aquando da realização da recolha de amostras
(Original)

Não raras vezes estes animais alimentam-se no mesmo local – sobretudo no que diz respeito à água – e os cães quase sempre circulam livremente, perpetuando a contaminação ambiental, nomeadamente de produtos hortícolas e frutas, que depois são potencialmente ingeridos pelo Homem.

Estes cães contactam obviamente, e ainda, com o Homem. David de Moraes (2007) refere no seu estudo realizado em Portugal que 68,5% dos doentes com hidatidose, possuíam ou já tinham possuído cão. A posse de cão, ou ter contacto com ele, é um factor de risco para a doença bem identificado (Craig et al., 2007). Assim, a correcta desparasitação do mesmo é fundamental na prevenção da

doença. Apesar de nove criadores (3%) terem afirmado conhecer a hidatidose, apenas cinco sabiam ser zoonótica e destes, apenas dois souberam identificar formas de transmissão da doença ao Homem, e numa forma muito genérica. O desconhecimento é por isso alarmante. Eddi et al. (2004) recordam que a falta de conhecimento dos humanos sobre a doença permite a sua perpetuação. As doenças transmitidas entre as espécies pecuárias e silvestres podem ter graves impactos na saúde animal e humana, contudo o conhecimento dos produtores pecuários sobre estas doenças é escasso (de Garine-Wichatitsky et al., 2013), o que pode ser grave, na medida em que o sucesso das medidas de controlo destas doenças depende grandemente da consciencialização dos produtores (Munyeme et al., 2010). Um considerável número de criadores (n=69) no nosso estudo, não manifestou interesse em receber informação sobre a doença, o que nos lembra que o desenvolvimento de estratégias para informar a comunidade do risco e da prevenção das zoonoses deve ser baseado não só nos resultados da investigação científica dos factores de risco, mas também na análise da percepção do problema pela comunidade (Hansen et al., 2003, Slovic et al., 2005). A educação para a saúde é necessária e devem-se privilegiar os métodos de participação activa da comunidade, pois só quando esta se sente envolvida será capaz de colaborar na prevenção da doença. Assim, importa saber de que formas este grupo gostaria de receber informação sobre a doença. O médico veterinário parece ser o veículo de informação preferido destes inquiridos, embora os médicos, nomeadamente os médicos de família, também tenham sido referidos. Efectivamente, urge a implementação do conceito de “Uma só Saúde”, nomeadamente através duma comunicação muito mais eficiente entre os profissionais de saúde ambiental, animal e humana, e entre estes e a comunidade. A consciencialização sobre a existência e importância das zoonoses permitirá aos veterinários e médicos colaborar na prevenção e tratamento da doença em animais e humanos (Mani & Maguire, 2009).

Vários estudos referem que os médicos delegam a educação para a saúde no que diz respeito às zoonoses nos veterinários (Grant & Olsen, 1999, Kersting et al., 2009), mas estes também nem sempre se vêem nesse papel. De facto, urge que os médicos veterinários actuem também como fonte de informação sobre zoonoses, nomeadamente as transmitidas por canídeos, sobretudo considerando os resultados das nossas coprologias em hospedeiro definitivo doméstico, o cão. A variedade e frequência de agentes parasitários zoonóticos identificados é

notável. Devido ao papel fundamental que o hospedeiro definitivo tem na transmissão da doença, nomeadamente ao Homem (Carmena & Cardona, 2013), a pesquisa de *Echinococcus granulosus* nestes hospedeiros é um ponto chave no desenvolvimento de estudos epidemiológicos e na implementação de programas de controlo da doença (Eckert et al., 2001). Os ovos de *Echinococcus* são imediatamente infectantes (Deplazes et al., 2011, Jenkins et al., 2011) e altamente resistentes no ambiente, pelo que a contaminação ambiental gerada pelos hospedeiros definitivos é um parâmetro muito importante a ter em conta. Efectivamente no presente estudo em hospedeiros definitivos domésticos não foi identificado *Echinococcus*, contudo foram identificados ovos de *Taenia*, sugerindo que as práticas de risco que permitiriam perpetuar o ciclo biológico de *Echinococcus* estão presentes. De facto, a técnica usada tem reconhecidamente uma baixa sensibilidade para ovos Taeniidae, além de que os proglótides deste cestode são pequenos e raramente se conseguem identificar nas fezes (CFSPH, 2011). É verdade que existem técnicas com maior sensibilidade - como a detecção por copro-antigénios - mas apenas em infecções moderadas a elevadas (Deplazes et al., 2011), que se suspeitou fortemente não ser o caso na região em estudo. Além disso, com esta técnica ocorrem muitas reacções cruzadas com *Taenia* spp. ou outros helmintes (Torgerson & Deplazes, 2009), e finalmente, pretendia-se também genotipar os possíveis ovos de *Echinococcus* identificados, pelo que a opção pelos métodos directos pareceu mais exequível. Ainda assim, as prevalências de ovos Taeniidae encontradas neste estudo (0,34% em amostras ambientais, 0,51% em amostras de cães de exploração e 1,98% em amostras de cães de caça) ultrapassaram largamente as de um estudo transversal realizado na Alemanha e em outros países europeus (0,25%) (Dyachenko et al., 2008). Bastante relevante é também a prevalência e diversidade de outros parasitas zoonóticos identificados no estudo, assim como a sua plena disseminação pelo Concelho.

O factor mais importante na frequência e intensidade de infecção do cão com *Echinococcus* é o seu potencial acesso a vísceras cruas e infectadas (Otero-Abad & Torgerson, 2013). No inquérito aos criadores, verificou-se que a probabilidade de alimentar cães com vísceras cruas crescia à medida que aumentava o número de cães detido pelo criador. Considerando que os caçadores normalmente tem matilhas com vários cães, a probabilidade destes serem alimentados com vísceras cruas poderá ser maior. Ser proprietário de um grande número de cães é um factor de risco para a hidatidose, e alimentá-los com

vísceras cruas aumenta esse risco quatro vezes (Campos-Bueno et al., 2000). Os cães de caça deste estudo tem a mais elevada frequência de positividade para os ovos Taeniidae, o que está de acordo com o descrito anteriormente, apesar de não serem de *Echinococcus*, mais uma vez as práticas de risco estão presentes, pelo que havendo um foco de infecção, ela instalar-se-á facilmente. A frequência de positividade total de helmintes encontrada nos cães de caça foi surpreendentemente alta (81%), e o risco de estes cães terem infecções múltiplas é substancialmente maior. Alguns autores defendem que os cães errantes e os cães de exploração são mais vulneráveis à infecção por *Echinococcus* (Benito et al., 2003, Benito et al., 2006, Otero-Abad & Torgerson, 2013). Contudo, há autores que referem um risco de infecção para *Echinococcus* muito superior em cães de caça (Kern et al., 2004). Vários estudos descrevem um maior risco de infecção por *Echinococcus granulosus* em cães jovens (com menos de dois anos de idade), comparando com os adultos (Otero-Abad & Torgerson, 2013). Supondo que o mesmo se verificará no que diz respeito a infecções por *Taenia* spp., compreende-se que seja nos cães de caça que o risco seja maior, já que estes serão tradicionalmente cães mais jovens e com destreza física. No que diz respeito a possíveis explicações para a elevada prevalência de helmintes nos cães de caça, estas poderão passar pelo facto destes animais serem mantidos em canis com elevada densidade populacional, assim como, com poucas condições de higiene. No inquérito verificou-se que os proprietários não só não desparasitam como quando o fazem, fazem numa frequência insuficiente e não recolhem as fezes para eliminar nos dias seguintes à desparasitação, o que promove uma disseminação de fezes potencialmente infectadas com formas parasitárias (Taylor et al., 2007), e uma constante contaminação ambiental (Chomel, 2008). Além das questões da desparasitação e higiene (ou da falta delas), os resultados estarão também relacionados com más práticas na caça. De facto, e estranhamente, não são abundantes os estudos ou a literatura sobre as zoonoses passíveis de serem transmitidas através da caça e dos cães de caça. Para a protecção do caçador – e sobretudo da família do caçador que muitas das vezes prepara a caça que este leva para casa – as boas práticas na caça deveriam passar pela manipulação de animais silvestres com luvas e outros equipamentos de protecção individual (CFSPH, 2011), o que, durante este estudo e nas montarias acompanhadas, nunca aconteceu. A importância de envolver as mulheres dos caçadores, enquanto educadoras e manipuladoras de alimentos, em acções de formação/informação relativas às boas práticas é reforçada por alguns autores (Metwally et al., 2006).

De regresso aos caçadores, muitas vezes a evisceração das carcaças, nomeadamente de ungulados e leporídeos, é feita no monte, e as vísceras são aí deixadas, à mercê de carnívoros domésticos e silvestres. Se essas vísceras tiverem quistos férteis, a viabilidade dos protoescólices pode manter-se durante 36 dias quando a temperatura está entre os -10°C e os 0°C (Diker et al., 2007).

Embora outros carnívoros possam ser hospedeiros definitivos, nenhum como o cão tem um papel tão importante, nomeadamente na “ponte” que faz entre os ciclos silváticos e domésticos de diversas doenças (Jenkins et al., 2011). No que diz respeito ao papel de animais silvestres na hidatidose humana, diz-se que será pouco relevante quando comparado com o dos animais do ciclo doméstico (Thompson & McManus, 2002), contudo, McManus et al. (2003) referem que a doença no Homem quando de origem silvestre, e especialmente se afectar o fígado, tem consequências clínicas potencialmente graves. Acresce que os animais silvestres podem ter grande importância enquanto reservatórios e perpetuadores da transmissão da doença, constituindo uma fonte de infecção quer para animais domésticos quer para o Homem (Jenkins et al., 2005), sendo por isso o seu estudo defendido por Cardona & Carmena (2013) como área de investigação prioritária para a hidatidose. O facto de as explorações extensivas e em modo de produção biológico estar a aumentar também sublinha a necessidade de ser mantida toda a atenção em relação aos animais silvestres enquanto contaminantes ambientais (Gortazar et al., 2007, Chomel, 2008). Por outro lado, cada vez mais se desenvolvem actividades ao ar livre em ambientes naturais e protegidos, favorecendo o contacto do Homem com animais silvestres ou com os seus dejectos (Deplazes et al., 2011). Isto mesmo poderá acontecer num dos locais onde decorreu parte deste estudo – a Área Protegida das Lagoas de Bertiandos e S. Pedro d’Arcos. De facto, trata-se duma área protegida atravessada por extensos percursos pedestres, essencialmente em passadiços elevados sobre as lagoas, onde se cruzam necessariamente e diariamente centenas de animais domésticos, silvestres e de pessoas. O facto de terem sido encontradas formas parasitárias zoonóticas em quase metade das amostras de ginja reforça a necessidade de ser dada atenção aos animais silvestres enquanto possíveis agentes de contaminação ambiental. Otero-Abad & Torgerson (2013) lembram que é em cães que residem em áreas sub-urbanas que são encontradas as mais elevadas prevalências no que à equinococose diz respeito. Ora, é geralmente nestas áreas na periferia das cidades que existem precisamente os

parques verdes, tal como acontece com esta Área Protegida, ligeiramente afastadas da urbe. Apesar de não ter sido possível saber se a amostra positiva para ovos Taeniidae era do género *Taenia* ou *Echinococcus*, o facto é que a prevalência destes ovos foi bem superior à dos carnívoros domésticos. Se olharmos aos resultados da coprologia parasitária dos lobos ibéricos essa frequência de positividade duplica. A identificação por técnicas de biologia molecular dos ovos Taeniidae dos lobos ibéricos ainda não foi realizada, e efectivamente, há muito poucos estudos sobre *Echinococcus granulosus* em animais silvestres, ainda que haja quem defenda que estes são os responsáveis pela ineficiência da erradicação da doença em plataformas continentais. As amostras de lobos ibéricos às quais tivemos acesso são de alcateias da Galiza, contudo estes animais deslocam-se podendo estar presentes também no norte de Portugal. Thompson & Jenkins (2014) referem que canídeos silvestres na Austrália tem um território de em média 100 km², assim, grandes áreas geográficas podem ser contaminadas com ovos de apenas um animal. Efectivamente *Echinococcus granulosus* foi identificado recentemente em lobos ibéricos no norte de Espanha (Sobrino et al., 2006) e em Portugal (Guerra et al., 2013). Em hospedeiros intermediários silvestres, poderá ser também difícil fazer a identificação deste parasita, já que os quistos nestes animais são escassos, dificultando a sua identificação e diagnóstico (Petrigh & Fugassa, 2013, Carmena & Cardona, 2014). Apesar de Carmena & Cardona (2014) referirem que os genótipos G1-G7 circulam essencialmente no ciclo doméstico, os mesmos tem sido identificados em animais silvestres (Sobrino et al., 2006, Umhang et al., 2014), nomeadamente em Portugal (Vieira-Pinto et al., 2011, Guerra et al., 2013), e tal como aconteceu neste trabalho. Há autores que atribuem este facto a um possível *spill-over* que faz com que os animais silvestres se tornem reservatórios de agentes patogénicos provenientes dos animais domésticos (Thompson, 2013). De facto, o papel dos animais silvestres enquanto reservatórios e amplificadores de agentes patogénicos emergentes para os animais domésticos e para o Homem, tem recebido bastante atenção nos últimos anos. Contudo, pouco tem sido o interesse manifestado no estudo da possível transmissão de agentes patogénicos de origem antropogénica (particularmente parasitas) para os animais silvestres, e que pode ter um impacto considerável na medicina da conservação (Thompson et al., 2009). Geralmente é dada pouca importância ao papel dos animais silvestres no controlo de doenças zoonóticas, mas a evidência de que a diminuição da população de abutres foi associada à dificuldade em controlar o aumento de

prevalência da hidatidose na Índia (Markandya et al., 2008) relembra-nos a necessidade de olhar a doença numa perspectiva holística.

Na verdade, a caracterização da transmissão de doenças zoonóticas com reservatórios silvestres é uma tarefa complexa, geralmente dificultada pelo conhecimento limitado dos agentes patogénicos e susceptibilidade destes hospedeiros (Macphee & Greenwood, 2013). A aplicação de ferramentas mais recentes como a biologia molecular, tem permitido caracterizar os agentes parasitários e melhorar o conhecimento da ecologia das doenças parasitárias, incluindo o fluxo entre animais domésticos, silvestres e o Homem. Estas técnicas também permitirão aquilatar, por exemplo, sobre a especificidade do hospedeiro (Thompson et al., 2009).

Para podermos proceder à aplicação de técnicas de biologia molecular, nomeadamente no que diz respeito às formas larvares, os quistos hidáticos, precisamos recolher amostras. Já foi amplamente referido anteriormente que a inspecção sanitária é uma ferramenta indispensável no controlo desta doença (EFSA, 2009). Curiosamente, há muito poucos estudos sobre a performance da inspecção sanitária na detecção de quistos hidáticos (Staerk et al., 2014). Contudo, considerando a sua reduzida sensibilidade para a detecção de alguns quistos hidáticos de pequeno tamanho, sobretudo em animais jovens (Torgerson & Heath, 2003, Barnes et al., 2012), contamos que haja sub-notificação de casos (Banda et al., 2013). Torgerson & Budke (2003) referem por isso que os dados epidemiológicos do matadouro são potencialmente enviesados, também pelos motivos já referidos no Capítulo VIII.

Os dados referentes à hidatidose animal em Portugal, enquanto doença de declaração obrigatória que é, são escassos, uma vez que não se encontram disponíveis para consulta pública. Num documento da autoridade para a segurança alimentar europeia (EFSA, 2013) é referida a importância do contributo dos dados regionais sobre *Echinococcus* para a determinação do padrão geográfico de disseminação da doença.

No que diz respeito à análise de ocorrência e caracterização dos quistos hidáticos neste estudo, identificamos com confirmação de análise de biologia molecular, quistos hidáticos em duas espécies de ungulados silvestres – javali (*Sus scrofa*) e veado (*Cervus elaphus*) - e em três espécies de ungulados domésticos (bovinos, ovinos e suínos). Também identificamos uma lesão

compatível com hidatidose num fígado de um equídeo, mas não foi possível confirmá-la pela análise genética. De facto, os caprinos parecem ter um menor risco de infecção que os ovinos (Otero-Abad & Torgerson, 2013), uma vez que não identificamos quistos nesta espécie. Neste estudo existe um ponto fraco, que é o facto de não termos acesso à idade dos animais nos quais foram encontrados quistos hidáticos, à excepção dos ovinos, que sabemos terem todos mais de 18 meses de vida. Azlaf & Dakkak (2006) descrevem que os animais com mais de cinco anos de vida são os mais frequentemente infectados no seu estudo. E na verdade, a infecção em animais jovens é muito mais relevante do ponto de vista epidemiológico do que em animais adultos (Torgerson & Budke, 2003, Thompson, 2008). Entretanto, se por um lado, os dados epidemiológicos recolhidos em matadouro são potencialmente enviesados (Torgerson & Budke, 2003), por outro, os estudos realizados com animais silvestres estimam apenas prevalências pontuais (Otero-Abad & Torgerson, 2013), tal como acontece no nosso caso. Em Portugal, tal pode-se dever ao facto de não haver inspecção sanitária sistemática de ungulados silvestres, o que, por este e muitos outros motivos, era importante implementar. A EFSA recomenda claramente a monitorização da doença em animais silvestres (EFSA, 2009).

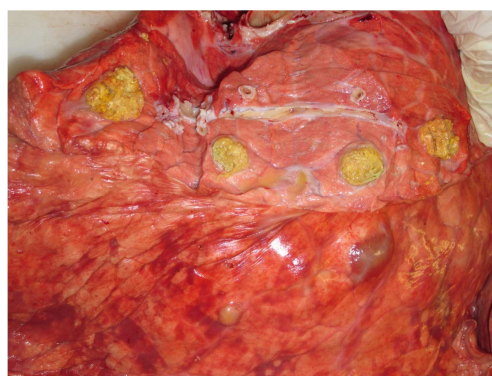
A EFSA recomenda também que todos os casos de hidatidose detectados em matadouro – independentemente de terem resultado na reprovação parcial ou total da carcaça – sejam declarados às autoridades. Sugere ainda que os quistos sejam recolhidos e enviados para laboratórios de referência, com indicação do hospedeiro no qual foi recolhido e do local de origem (EFSA, 2009). A avaliação da fertilidade dos quistos encontrados é também um parâmetro relevante avaliar, na medida em que providencia informação muito importante sobre a epidemiologia da doença (Scala et al., 2006, Varcasia et al., 2006). No que à inspecção sanitária diz respeito, no Capítulo VII ficou claro que, para a correcta identificação da hidatidose, não só é muito importante que se façam incisões, como também que haja uma colaboração efectiva e eficaz com laboratórios. Macroscopicamente há diversas lesões passíveis de serem consideradas diagnósticos diferenciais de hidatidose, e apenas com análise histológica e sobretudo genética, é possível confirmá-lo. De igual modo, os quistos hidáticos podem ter aspectos macroscópicos muito distintos. Nas Figuras 9.3 – 9.7 mostramos aspectos bem distintos de alguns dos quistos hidáticos de bovinos confirmados por análise de biologia molecular.



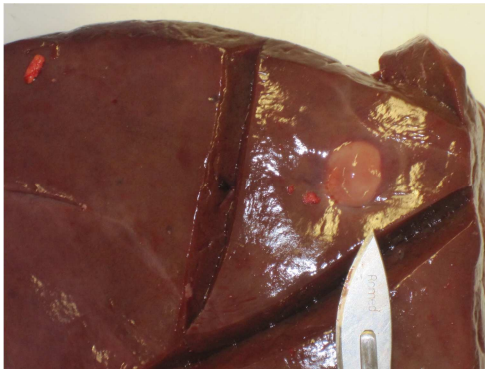
Figura 9.3 – Quistos hidáticos em pulmão e fígado de bovino (Original)



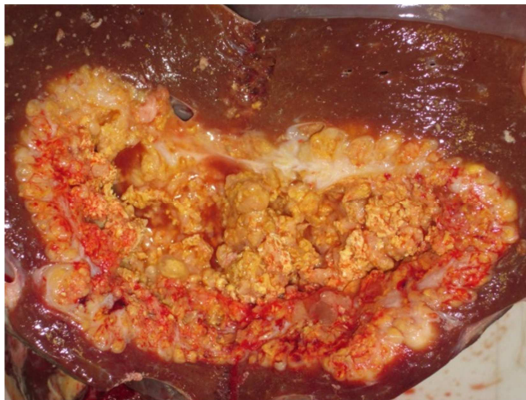
Figuras 9.4 – Quistos hidáticos em pulmões de bovino (Original)



Figuras 9.5 – Quistos hidáticos em pulmões de bovino (Original)

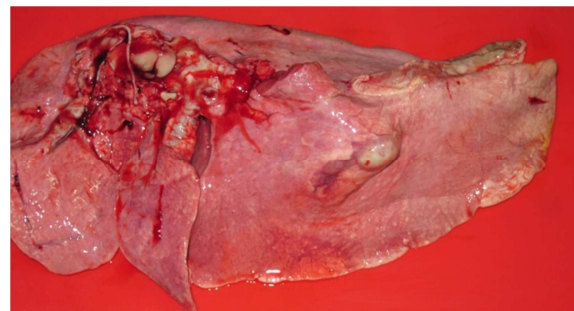


Figuras 9.6 – Quistos hidáticos em fígados de bovino (Original)

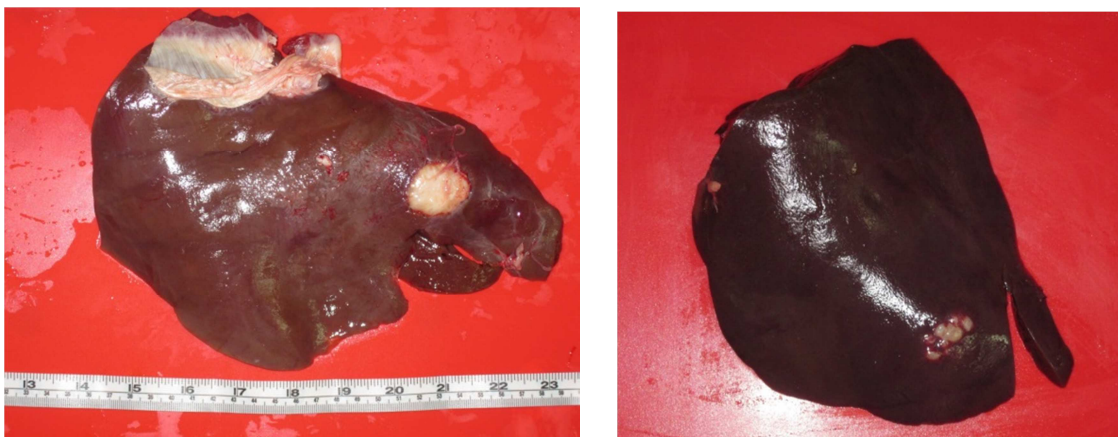


Figuras 9.7 – Quistos hidáticos em fígados de bovino (Original)

No caso dos ovinos a dificuldade é idêntica ou talvez ainda maior como as Figuras 9.8 e 9.9 podem comprovar.



Figuras 9.8 – Quistos hidáticos em pulmões de ovino (Original)



Figuras 9.9 – Quistos hidáticos em fígados de ovino (Original)

Nos ovinos é relativamente frequente a ocorrência de múltiplas lesões compatíveis com parasitoses zoonóticas (Figura 9.10), à semelhança do que aconteceu no estudo com os cães, o que sugere que as doenças parasitárias são de facto negligenciadas.

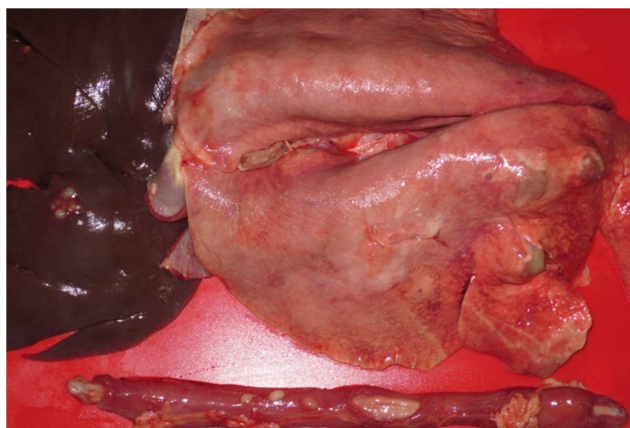


Figura 9.10 – Quistos hidáticos pulmonares e hepáticos e lesões compatíveis com sarcosporidiose no esófago (Original)

Tal como já foi descrito no capítulo VII, a maioria dos quistos de ruminantes domésticos eram férteis. De certa forma surpreendentemente, os quistos de bovinos mostraram ser mais frequentemente férteis do que os de ovinos. Zhang et al. (2003) explicam a baixa fertilidade dos quistos hidáticos em bovinos pela ocorrência duma imunidade natural que inibe o desenvolvimento do quisto, contudo os resultados do nosso estudo estão em contraste com esta evidência. Os nossos resultados podem sugerir que a estirpe que está a infectar os bovinos em Portugal poderá estar bem adaptada a este hospedeiro, como os polimorfismos encontrados nas análises de biologia molecular realizadas até à

data parecem corroborar. Parece-nos interessante também o facto a doença estar aparentemente distribuída a nível nacional, ressalvando sempre que a localização geográfica relativa à origem dos animais infectados foi feita com base na sua última “morada”. De facto a importância de determinados genótipos e a proporção de quistos estéreis parece variar com a região geográfica (CFSPH, 2011). Reforçamos por isso a necessidade de manter toda a atenção à epidemiovigilância da hidatidose nos bovinos, na medida em que estes poderão ter um papel mais importante na transmissão e manutenção da doença do que o que previamente se julgava. Neste estudo foi identificada uma lesão compatível com quisto hidático calcificado no fígado de um equídeo. O facto de estar calcificado leva a pressupor que a infecção teria sido causada por uma estirpe não adaptada aos equídeos, tal como sugerido por Azlaf & Dakkak (2006).

Um documento da EFSA (EFSA, 2009) refere a existência dos genótipos G1, G2 e G3 em Portugal, contudo aparentemente a diversidade será maior, nomeadamente o genótipo G7 foi já identificado em suínos (Castro et al., 2006) e em bovinos (Beato et al., 2013).

Neste estudo foram identificados os genótipos G1, G2 e G7, assim como diversos polimorfismos dentro de cada genótipo e de cada hospedeiro, tal como apresentado no Capítulo VIII. Todas as amostras de ovinos, algumas de bovinos e a de cervídeo foram identificadas com o genótipo G1. Este genótipo é responsável pela grande maioria de casos humanos de hidatidose no mundo (Rojas et al., 2014), e é também aquele que está mais disseminado no Sul da Europa (Romig et al., 2006). Em muitas zonas do mundo os bovinos estão infectados com o genótipo G1, mas estes contribuirão muito pouco para a transmissão da doença uma vez que os quistos deste genótipo são maioritariamente estéreis nesta espécie (McManus & Thompson, 2003). Contudo a percentagem de quistos de bovinos férteis neste trabalho não é negligenciável. Além disso, o genótipo G1 identificado em ovinos demonstrou ter significativas diferenças genéticas em relação ao identificado nas amostras de bovinos. Mais próximo dos bovinos ficou o genótipo do cervídeo, o que nos leva a pensar numa fonte de infecção comum para estas espécies doméstica e silvestre. Este genótipo foi identificado em cervídeos na Roménia (Onac et al., 2013), assim como *E. canadensis* noutras regiões (Lavikainen et al., 2003, Schurer et al., 2013).

Nas amostras de bovinos identificamos também o genótipo G2, recentemente identificado pela primeira vez em França (Umhang et al., 2013).

No que diz respeito ao javali, identificamos o genótipo G7. Nesta espécie, já foram identificados os genótipos G1 (Mwambete et al., 2004, Martín-Hernando et al., 2008, Onac et al., 2013) e G7 (Mwambete et al., 2004, Onac et al., 2013, Umhang et al., 2014). A transmissão do genótipo G7 parece estar bem descrita em zonas da Europa Central e de Leste, onde os suínos são o mais importante hospedeiro intermediário, havendo vários casos descritos em humanos com este genótipo (Rojas et al., 2104). Umhang et al. (2014) referem a sua existência na Córsega em suínos domésticos e javalis em níveis preocupantes para a Saúde Pública, assim como Varcasia et al. (2006) em suínos na Sardenha. Varcasia et al. (2007) identificaram este genótipo em pequenos ruminantes da Grécia. Em Espanha também já foi identificado em suínos domésticos e silvestres (Mwambete et al., 2004). Há autores que reforçam que os casos humanos de infecção pelo genótipo G7 tem sido subestimados e que na Europa Central estes serão deveras importantes, nomeadamente na Áustria, onde é o mais frequentemente envolvido em casos humanos (Schneider et al., 2008, 2010).

Todos os genótipos identificados são passíveis de infectar o Homem, contudo, devemos ser cautelosos quando avaliamos os possíveis graus de infecciosidade dos diferentes genótipos de *Echinococcus granulosus* para o Homem, já que neste, a prevalência de determinados genótipos é influenciada, entre outras coisas, pela abundância relativa desses genótipos nos hospedeiros intermediários, assim como pelo potencial contacto do Homem com hospedeiros definitivos infectados e pelo seu comportamento social no que diz respeito à relação com o cão e ao abate caseiro. Ainda, os pacientes infectados com o genótipo G7 desenvolvem quistos hidáticos mais pequenos que os infectados com o genótipo G1, sendo por isso os quistos G7 mais frequentemente identificados acidentalmente (Rojas et al., 2014). No que aos genótipos diz respeito, reforçamos a primeira identificação de genótipos em hospedeiros intermediários silvestres em Portugal, no javali e no cervídeo, confirmando a circulação deste parasita no ciclo silvestre. Notamos também os polimorfismos genéticos encontrados, nomeadamente em relação aos genótipos dos bovinos, o que, associado ao facto dos quistos desta espécie se terem apresentado mais férteis do que o esperado, nos chama a atenção para a necessidade de continuar a recolher e analisar geneticamente os quistos de bovinos.

As mudanças que estão a ocorrer nos estilos de vida, na alimentação e nos próprios sistemas agrícolas e naturais, impõe uma abordagem integrada e holística das doenças zoonóticas (Kachani & Heath, 2014). A integração das ciências veterinárias, médicas e ambientais, necessária para prever, prevenir e responder às doenças zoonóticas emergentes, requer uma colaboração efectiva e a troca de conhecimento inter-disciplinar (Anholt et al., 2012). Recentemente a OMS incluiu a hidatidose humana no grupo das doenças tropicais negligenciadas, e recomenda uma estratégia de saúde pública veterinária como uma parte da abordagem para o controlo efectivo da doença (Savioli & Daumerie, 2010). Aparentemente, colectivamente, as zoonoses parasitárias tem uma carga de doença nos humanos semelhante a qualquer uma das três grandes doenças infecciosas em humanos: malária, tuberculose ou síndrome da imunodeficiência adquirida, além da carga de doença nos animais (Torgerson & Macpherson, 2011).

Contudo, as doenças parasitárias precisam de deixar de ser vistas como “um parente pobre” da saúde. De facto, e tal como Chomel (2008) descreve, as soluções para o controlo destas doenças já existem, mas faltam ser alocadas fontes de financiamento apropriadas para a sua implementação sustentável.

A necessidade de promover a educação para a saúde quer a profissionais de saúde, quer a grupos de risco (produtores, agricultores, caçadores, crianças, entre outros) é mais do que evidente. Esta deverá passar por comunicar efectivamente com as pessoas envolvidas, e não somente informar. Tal como Anholt et al. (2012) referem, as relações pessoais são críticas para a geração e transferência de conhecimento, assim como uma efectiva capacidade de comunicação. E aparentemente, a *compliance* das pessoas aos programas de controlo de doenças nos meios rurais é maior do que em meios urbanos (Chomel, 2008), pelo que urge colocar em prática esta educação para a saúde.

No futuro seria interessante reproduzir os estudos de coprologias do cão e os inquéritos a grupos de risco noutros Concelhos de Portugal, assim como implementar acções de educação para a saúde sobre doenças zoonóticas parasitárias particularmente direccionadas a caçadores, criadores de espécies pecuárias, crianças, e sobretudo, para os profissionais de saúde (humana, veterinária e ambiental), ainda muito pouco sensibilizados para estas doenças. Importante seria também avaliar a ocorrência destas doenças parasitárias na

população humana deste e de outros Concelhos, naquilo que seria a aplicação plena do conceito de “Uma só Saúde”.

Urge ainda a implementação sistemática de práticas de inspecção sanitária em animais silvestres, nomeadamente cervídeos e javalis. Deveria ser estimulado o registo e notificação de causas de reprovação, ainda que parcial, por hidatidose, em matadouro, assim como disponibilizado aos inspectores sanitários apoio laboratorial. Por fim, é necessário continuar a desenvolver estudos de caracterização de genótipos e de possíveis hospedeiros envolvidos na epidemiologia da doença em Portugal.

Capítulo X

Referências Bibliográficas

- ABBASI, I., BRANZBURG, A., CAMPOS-PONCE, M., ABDEL HAFEZ, S. K., RAOUL, F., CRAIG, P. S. & HAMBURGER, J. 2003. Copro-diagnosis of Echinococcus granulosus infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 69, 324-30.
- ACOSTA-JAMETT, G., CLEAVELAND, S., CUNNINGHAM, A. A., BRONSVOORT, B. M. D. & CRAIG, P. S. 2010. Echinococcus granulosus infection in humans and livestock in the Coquimbo region, north-central Chile. *Veterinary Parasitology*, 169, 102-110.
- ALONSO, J. M., PEREIRA, S., RODRIGUES, G. & VIEIRA, O. S. 2010. *Área de Paisagem Protegida das Lagoas de Bertandos e S. Pedro D'Arcos uma Escola de Ambiente Natureza e Mundo Rural*, Município de Ponte de Lima.
- ALTAS, M., ARAS, M., SERARSLAN, Y., DAVRAN, R., EVIRGEN, O. & YILMAZ, N. 2010. A medically treated multiple cerebral hydatid cyst disease. *Journal of Neurosurgical Sciences*, 54, 79-82.
- AMMANN, R. W. & ECKERT, J. 1996. Cestodes. Echinococcus. *Gastroenterol Clin North Am*, 25, 655-89.
- ANHOLT, R. M., STEPHEN, C. & COPES, R. 2012. Strategies for Collaboration in the Interdisciplinary Field of Emerging Zoonotic Diseases. *Zoonoses and Public Health*, 59, 229-240.
- ANONYMOUS 2011. Estatísticas Demográficas. 2013 ed.: National Statistics Institute - Portugal Statistics.
- ANSARI, M. M., HALEEM, S., ALI, W. M., ENZUNG, L. J., ALI, S. S. & MEET, S. K. 2014. Low tension breast hydatid cyst--a case report. *Journal of infection and public health*, 7, 233-6.
- APT, W., PEREZ, C., GALDAMEZ, E., CAMPANO, S., VEGA, F., VARGAS, D., RODRIGUEZ, J., RETAMAL, C., CORTES, P., ZULANTAY, I. & DE RYCKE, P. H. 2000. Echinococcosis/hydatidosis in the VII Region of Chile: diagnosis and educational intervention. *Rev Panam Salud Publica*, 7, 8-16.
- ARAMBULO, P. 1997. Public health importance of cystic echinococcosis in Latin America. *Acta Tropica*, 67, 113-124.
- AREOSA, F. A. G. 1924. *Quistos hidáticos do fígado*. Doutoramento, Faculdade de Medicina do Porto.
- ARMUA-FERNANDEZ, M. T., CASTRO, O. F., CRAMPET, A., BARTZABAL, A., HOFMANN-LEHMANN, R., GRIMM, F. & DEPLAZES, P. 2014. First case of peritoneal cystic echinococcosis in a domestic cat caused by Echinococcus

- granulosus sensu stricto (genotype 1) associated to feline immunodeficiency virus infection. *Parasitology International*, 63, 300-302.
- AZLAF, R. & DAKKAK, A. 2006. Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. *Veterinary Parasitology*, 137, 83-93.
- BALLWEBER, L. R. 2001. *Veterinary Parasitology*, St. Louis, Elsevier Health Sciences. 328pp.
- BARDONNET, K., BENCHIKH-ELFEGOUN, M. C., BART, J. M., HARRAGA, S., HANNACHE, N., HADDAD, S., DUMON, H., VUITTON, D. A. & PIARROUX, R. 2003. Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. *Veterinary Parasitology*, 116, 35-44.
- BARNES, T. S., DEPLAZES, P., GOTTSTEIN, B., JENKINS, D. J., MATHIS, A., SILES-LUCAS, M., TORGERSON, P. R., ZIADINOV, I. & HEATH, D. D. 2012. Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. *Acta Tropica*, 123, 1-7.
- BARNES, T. S., GOLDIZEN, A. W., MORTON, J. M. & COLEMAN, G. T. 2008. Cystic echinococcosis in a wild population of the brush-tailed rock-wallaby (*Petrogale penicillata*), a threatened macropodid. *Parasitology*, 135, 715-723.
- BART, J. M., MORARIU, S., KNAPP, J., ILIE, M. S., PITULESCU, M., ANGHEL, A., COSOROABA, I. & PIARROUX, R. 2006. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitology Research*, 98, 130-137.
- BATTELLI, G. 2009. Echinococcosis: costs, losses and social consequences of a neglected zoonosis. *Vet Res Commun*, 33 Suppl 1, 47-52.
- BEATO, S., PARREIRA, R., CALADO, M. & GRACIO, M. A. A. 2010. Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal. *Parasitology International*, 59, 638-642.
- BEATO, S., PARREIRA, R., ROQUE, C., GONCALVES, M., SILVA, L., MAURELLI, M. P., CRINGOLI, G. & GRACIO, M. A. 2013. *Echinococcus granulosus* in Portugal: The first report of the G7 genotype in cattle. *Veterinary Parasitology*, 198, 235-239.
- BENITO, A., CARMENA, D., JOSEPH, L., MARTINEZ, J. & GUI SANTES, J. A. 2006. Dog echinococcosis in northern Spain: comparison of coproantigen and serum antibody assays with coprological exam. *Vet Parasitol*, 142, 102-11.

- BENITO, A., CARMENA, D., POSTIGO, I., ESTIBALEZ, J. J., MARTINEZ, J. I. & GUI SANTES, J. A. 2003. Intestinal helminths in dogs in Alava, North of Spain. *Revista Ibérica de Parasitología*, 63, 121-126.
- BENNER, C., CARABIN, H., SANCHEZ-SERRANO, L. P., BUDKE, C. M. & CARMENA, D. 2010. Analysis of the economic impact of cystic echinococcosis in Spain. *Bulletin of the World Health Organization*, 88, 49-57.
- BHATTACHARYA, D., BERA, A. K., BERA, B. C., MAITY, A. & DAS, S. K. 2007. Genotypic characterisation of Indian cattle, buffalo and sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. *Veterinary Parasitology*, 143, 371-374.
- BOWLES, J., BLAIR, D. & MCMANUS, D. P. 1992. GENETIC-VARIANTS WITHIN THE GENUS *ECHINOCOCCUS* IDENTIFIED BY MITOCHONDRIAL-DNA SEQUENCING. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54, 165-174.
- BOWLES, J. & MCMANUS, D. P. 1993a. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Tropica*, 53, 291-305.
- BOWLES, J. & MCMANUS, D. P. 1993b. NADH DEHYDROGENASE-1 GENE-SEQUENCES COMPARED FOR SPECIES AND STRAINS OF THE GENUS *ECHINOCOCCUS*. *International Journal for Parasitology*, 23, 969-972.
- BOWMAN, D. D., LYNN, R. C. & EBERHARD, M. L. 2004. *Georgis Parasitologia para Veterinários*, Elsevier. 8th Ed. Madrid. 440pp.
- BRUNETTI, E., KERN, P. & VUITTON, D. A. 2010. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica*, 114, 1-16.
- BRUZINSKAITE, R., SARKUNAS, M., TORGERSON, P. R., MATHIS, A. & DEPLAZES, P. 2009. Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Vet Parasitol*, 160, 237-41.
- BUDKE, C. M., DEPLAZES, P. & TORGERSON, P. R. 2006. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 296-303.
- BUISHI, I., WALTERS, T., GUILDEA, Z., CRAIG, P. & PALMER, S. 2005. Reemergence of canine *Echinococcus granulosus* infection, Wales. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 568-571.
- BUTCOVAN, D., GRIGORIU, C. & ASTARASTOAE, V. 2010. Cardiac echinococcosis causing unexpected death. A case report. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 18, 189-192.

- CAGLAYAN, K., CELIK, A., KOC, A., KUTLUK, A. C., ALTINLI, E., CELIK, A. S. & KOKSAL, N. 2010. Unusual Locations of Hydatid Disease: Diagnostic and Surgical Management of a Case Series. *Surgical Infections*, 11, 349-353.
- CAMPOS-BUENO, A., LÓPEZ-ABENTE, G. & ANDRÉS-CERCADILLO, A. M. 2000. Risk factors for Echinococcus granulosus infection: a case-control study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62, 329-334.
- CARABIN, H., BALSERA-RODRIGUEZ, F. J., REBOLLAR-SAENZ, J., BENNER, C. T., BENITO, A., FERNANDEZ-CRESPO, J. C. & CARMENA, D. 2014. Cystic echinococcosis in the Province of Alava, North Spain: the monetary burden of a disease no longer under surveillance. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3069.
- CARDONA, G. A. & CARMENA, D. 2013. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Veterinary Parasitology*, 192, 10-32.
- CARDOSO, A. S., COSTA, I. M. H., FIGUEIREDO, C., CASTRO, A. & CONCEICAO, M. A. P. 2014. The occurrence of zoonotic parasites in rural dog populations from northern Portugal. *Journal of helminthology*, 88, 203-9.
- CARMENA, D. & CARDONA, G. A. 2013. Canine echinococcosis: Global epidemiology and genotypic diversity. *Acta Tropica*, 128, 441-460.
- CARMENA, D. & CARDONA, G. A. 2014. Echinococcosis in wild carnivorous species: Epidemiology, genotypic diversity, and implications for veterinary public health. *Veterinary Parasitology*, 202, 69-94.
- CARMENA, D., SANCHEZ-SERRANO, L. P. & BARBERO-MARTINEZ, I. 2008a. Echinococcus granulosus infection in Spain. *Zoonoses and Public Health*, 55, 156-165.
- CARMENA, D., SANCHEZ-SERRANO, L. P. & BARBERO-MARTINEZ, I. 2008b. Echinococcus granulosus infection in Spain. *Zoonoses Public Health*, 55, 156-65.
- CASTRO, A., SILVA, E., FREIRE, L., CONCEIÇÃO, A. & COSTA, J. M. 2006. Relatório do Centro Regional de Saúde Pública do Norte. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
- CFSPH. 2011. Echinococcosis. Available: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf> [Accessed 22th October 2014].
- CHOMEL, B. B. 2003. Control and prevention of emerging zoonoses. *Journal of Veterinary Medical Education*, 30, 145-147.

- CHOMEL, B. B. 2008. Control and prevention of emerging parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 38, 1211-1217.
- CONCEIÇÃO, M. A., CRAVO, I., COSTA, I. H., CASTRO, A., SILVA, E., MENDES, C., SANTOS, J. & COSTA, J. M. 2007. Contributo para o estudo das helmintoses no cão, nos concelhos de Cantanhede e Miranda do Corvo. 7º Encontro SPEMVP, 2007 Peniche, Portugal.
- CONCEIÇÃO, M. A. P., SILVA, M., VELOSO, G., CASTRO, A., SILVA, E., CRAVO, I., BASTOS, M. A. & CORREIA DA COSTA, J. M. 2005. Hidatidose Suína - estudo de caso no conelho de Cantanhede. III Congresso Ibérico de Hidatidologia, 2005 Elvas.
- CORREA-PRISANT, M. 1999. Gathering Data on Culture and Health to Develop Educational Materials on Zoonoses for Subsistence Dairy Farmers in Costa Rica. *Journal of Agromedicine*, 6, 33-41.
- CRAIG, P. S. & LARRIEU, E. 2006. Control of cystic echinococcosis/hydatidosis: 1863-2002. *Advances in Parasitology*, Vol 61, 61, 443-+.
- CRAIG, P. S., MCMANUS, D. P., LIGHTOWLERS, M. W., CHABALGOITY, J. A., GARCIA, H. H., GAVIDIA, C. M., GILMAN, R. H., GONZALEZ, A. E., LORCA, M., NAQUIRA, C., NIETO, A. & SCHANTZ, P. M. 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis*, 7, 385-94.
- DAKKAK, A. 2010. Echinococcosis/hydatidosis: A severe threat in Mediterranean countries. *Veterinary Parasitology*, 174, 2-11.
- DAR, F. K. & ALKARMI, T. 1997. Public health aspects of cystic echinococcosis in the Arab countries. *Acta Tropica*, 67, 125-132.
- DAVID DE MORAIS, J. A. 1998. *A hidatidologia em Portugal*, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 334pp.
- DAVID DE MORAIS, J. A. 2006. Abordagem clínica integrada. Considerações a propósito de um caso de hidatidose múltipla grave. *Medicina Interna*, 13, 278-88.
- DAVID DE MORAIS, J. A. 2007. Hidatidose humana - estudo clínico-epidemiológico no distrito de Évora durante um quarto de século. *Acta Médica Portuguesa*, 20, 1-10.
- DAVID DE MORAIS, J. A. 2010. Progressão e declínio da hidatidose humana em Portugal: análise histórico-epidemiológica. *Medicina Interna*, 17, 274-285.
- DAVID DE MORAIS, J. A. 2011. The subspeciation of *Echinococcus granulosus* in Portugal. *Revista Portuguesa das Doenças Infecciosas*, 7, 131-139.

- DE GARINE-WICHATITSKY, M., MIGUEL, E., MUKAMURI, B., GARINE-WICHATITSKY, E., WENCELIUS, J., PFUKENYI, D. M. & CARON, A. 2013. Coexisting with wildlife in transfrontier conservation areas in Zimbabwe: Cattle owners' awareness of disease risks and perceptions of the role played by wildlife. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 36, 321-332.
- DEMIR, H. A., DEMIR, S., EMIR, S., KACAR, A. & TIRYAKI, T. 2010. Primary hydatid cyst of the rib mimicking chest wall tumor: a case report. *Journal of Pediatric Surgery*, 45, 2247-2249.
- DEMIRCAN, A., KELES, A., KAHVECI, F. O., TULMAC, M. & OZSARAC, M. 2010. CARDIAC TAMPONADE VIA A FISTULA TO THE PERICARDIUM FROM A HYDATID CYST: CASE REPORT AND REVIEW OF THE LITERATURE. *Journal of Emergency Medicine*, 38, 582-586.
- DEPLAZES, P. & ECKERT, J. 2001. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis--a zoonosis of public health significance. *Vet Parasitol*, 98, 65-87.
- DEPLAZES, P., VAN KNAPEN, F., SCHWEIGER, A. & OVERGAAUW, P. A. M. 2011. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Veterinary Parasitology*, 182, 41-53.
- DEWOLF, B. D., PEREGRINE, A. S., JONES-BITTON, A., JANSEN, J. T., MACTAVISH, J. & MENZIES, P. I. 2012. Distribution of, and risk factors associated with, sheep carcass condemnations due to *Cysticercus ovis* infection on Canadian sheep farms. *Veterinary Parasitology*, 190, 434-441.
- DGAV 2014. Lista das Doenças de Declaração Obrigatória em Portugal (actualizado em Fevereiro de 2014). Available: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=23555&generico=19316&cboui=19316>. [Accessed 22th October 2014].
- DGS 2007. Doenças de Declaração Obrigatória em Portugal. Available: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008987.pdf>. [Accessed 22th October 2014].
- DIKER, A. I., TINAR, R. & SENLIK, B. 2007. Viability of *Echinococcus granulosus* protoscolices at different conditions. *Veterinary Parasitology*, 150, 84-87.
- DORNY, P., PRAET, N., DECKERS, N. & GABRIEL, S. 2009. Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology*, 163, 196-206.
- DYACHENKO, V., PANTCHEV, N., GAWLOWSKA, S., VRHOVEC, M. G. & BAUER, C. 2008. *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats

- from Germany and other European countries. *Veterinary Parasitology*, 157, 244-253.
- ECKERT, J. 2003. Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Tropica*, 85, 157-163.
- ECKERT, J., CONRATHS, F. J. & TACKMANN, K. 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *International Journal for Parasitology*, 30, 1283-1294.
- ECKERT, J. & DEPLAZES, P. 1999. Alveolar echinococcosis in humans: The current situation in Central Europe and the need for countermeasures. *Parasitology Today*, 15, 315-319.
- ECKERT, J. & DEPLAZES, P. 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 107-+.
- ECKERT, J., GEMMELL, M. A., MESLIN, F.-X. & PAWŁOWSKI, Z. S. 2001. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*.
- ECKERT, J. & THOMPSON, R. C. A. 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Tropica*, 64, 19-34.
- EDDI, C., DE BALOGH, K., LUBROTH, J., AMANFU, W., SPEEDY, A. & BATTAGLIA, D. 2004. Veterinary public health activities at FAO: echinococcosis/hydatid disease. *Parassitologia (Rome)*, 46, 381-382.
- EDDI, C., DE KATALIN, B., LUBROTH, J., AMANFU, W., SPEEDY, A., BATTAGLIA, D. & DOMENECH, J. 2006. Veterinary public health activities at FAO: Cysticercosis and echinococcosis. *Parasitology International*, 55, S305-S308.
- EFSA 2009. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of *Echinococcus* in animals and foodstuffs in the European Union. European Union. Available: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/36e.htm>. [Accessed 22th October 2014].
- EFSA 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11, 250. Available:

- <http://www.efsa.europa.eu/en/publications/efsajournal.htm>. [Accessed 22th October 2014].
- EKIZ, F., COBAN, S., ONDER, E. O., TURAN, D., YUKSEL, I. & YUKSEL, O. 2010. A rare cause of dysphagia: esophageal hydatidosis. *Gastrointestinal Endoscopy*, 72, 1302-1303.
- ERYILMAZ, M. A., EROGLU, C., KARABAGLI, P. & COBANKARA, O. E. 2010. Gluteal Hydatid Cyst: Case Report. *Turkiye Klinikleri Tip Bilimleri Dergisi*, 30, 1380-1383.
- FONTANARROSA, M. F., VEZZANI, D., BASABE, J. & EIRAS, D. F. 2006. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): Age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Veterinary Parasitology*, 136, 283-295.
- FOREYT, W. J. 2001. *Veterinary Parasitology*, Blackwell Publishing. Iowa. USA. 5th Ed. 246pp.
- FRAZZOLI, C. & MANTOVANI, A. 2010. Toxicants exposures as novel zoonoses: reflections on sustainable development, food safety and veterinary public health. *Zoonoses Public Health*, 57, e136-42.
- GALANTINHO, A. & MIRA, A. 2009. The influence of human, livestock, and ecological features on the occurrence of genet (*Genetta genet*): a case study on Mediterranean farmland. *Ecological Research*, 24, 671-685.
- GARIPPA, G. 2006. Updates on cystic echinococcosis (CE) in Italy. *Parassitologia*, 48, 57-9.
- GATTI, A., ALVAREZ, A. R., ARAYA, D., MANCINI, S., HERRERO, E., SANTILLAN, G. & LARRIEU, E. 2007. Ovine echinococcosis I. Immunological diagnosis by enzyme immunoassay. *Veterinary Parasitology*, 143, 112-121.
- GESY, K., PAWLIK, M., KAPRONCZAI, L., WAGNER, B., ELKIN, B., SCHWANTJE, H. & JENKINS, E. 2013. An improved method for the extraction and quantification of adult *Echinococcus* from wildlife definitive hosts. *Parasitology Research*, 112, 2075-2078.
- GONZALEZ, L. M., DANIEL-MWAMBETE, K., MONTERO, E., ROSENZVIT, M. C., MCMANUS, D. P., GARATE, T. & CUESTA-BANDERA, C. 2002. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Experimental Parasitology*, 102, 46-56.
- GORAD, K., RAYATE, N., OSWAL, K., KRISHNA, A., DESHMUKH, A., RAJMANICKAM, S. & PUNTAMBEKAR, S. 2011. Laparoscopic removal of pelvic hydatid cysts

- in young female: a case report. *Minimally invasive surgery*, 2011, 346828-346828.
- GORTAZAR, C., FERROGLIO, E., HOEFLE, U., FROELICH, K. & VICENTE, J. 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, 53, 241-256.
- GOTTSTEIN, B., DAI, W. J., WALKER, M., STETTLER, M., MULLER, N. & HEMPHILL, A. 2002. An intact laminated layer is important for the establishment of secondary *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasitology Research*, 88, 822-828.
- GRACEY, J., COLLINS, D. S. & HUEY, R. 1999. *Meat Hygiene*, London, Edinburgh, New York, Philadelphia, Sydney, Toronto, WB Saunders. 10th Ed. 758pp.
- GRANT, S. & OLSEN, C. W. 1999. Preventing zoonotic diseases in immunocompromised persons: The role of physicians and veterinarians. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 159-163.
- GROSSO, G., GRUTTADAURIA, S., BIONDI, A., MARVENTANO, S. & MISTRETTA, A. 2012. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World Journal of Gastroenterology*, 18, 1425-1437.
- GUARNERA, E. A., SANTILLAN, G., BOTINELLI, R. & FRANCO, A. 2000. Canine echinococcosis: an alternative for surveillance epidemiology. *Veterinary Parasitology*, 88, 131-134.
- GUERRA, D., ARMUA-FERNANDEZ, M. T., SILVA, M., BRAVO, I., SANTOS, N., DEPLAZES, P. & CARVALHO, L. M. M. D. 2013. Taeniid species of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in Portugal with special focus on *Echinococcus* spp. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife*, 2, 50-3.
- HANSEN, J., HOLM, L., FREWER, L., ROBINSON, P. & SANDOE, P. 2003. Beyond the knowledge deficit: recent research into lay and expert attitudes to food risks. *Appetite*, 41, 111-121.
- HEATH, D., YANG, W., LI, T. Y., XIAO, Y. F., CHEN, X. W., HUANG, Y., YANG, Y., WANG, Q. & QIU, J. M. 2006. Control of hydatidosis. *Parasitology International*, 55, S247-S252.
- HEATH, D. D., JENSEN, O. & LIGHTOWLERS, M. W. 2003. Progress in control of hydatidosis using vaccination - a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. *Acta Tropica*, 85, 133-143.
- HEGGLIN, D., BONTADINA, F., GLOOR, S., ROMIG, T., DEPLAZES, P. & KERN, P. 2008. Survey of public knowledge about *Echinococcus multilocularis* in

- four European countries: need for proactive information. *BMC Public Health*, 8, 247.
- HIMSWORTH, C. G., JENKINS, E., HILL, J. E., NSUNGU, M., NDAO, M., THOMPSON, R. C. A., COVACIN, C., ASH, A., WAGNER, B. A., MCCONNELL, A., LEIGHTON, F. A. & SKINNER, S. 2010a. Short Report: Emergence of Sylvatic *Echinococcus granulosus* as a Parasitic Zoonosis of Public Health Concern in an Indigenous Community in Canada. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 643-645.
- HIMSWORTH, C. G., SKINNER, S., CHABAN, B., JENKINS, E., WAGNER, B. A., HARMS, N. J., LEIGHTON, F. A., THOMPSON, R. C. A. & HILL, J. E. 2010b. Short Report: Multiple Zoonotic Pathogens Identified in Canine Feces Collected from a Remote Canadian Indigenous Community. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 338-341.
- HUETTNER, M. & ROMIG, T. 2009. *Echinococcus* species in African wildlife. *Parasitology*, 136, 1089-1095.
- IUCN 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. . International Union for Conservation of Nature. Available: <http://www.iucnredlist.org/details/41698/0>. [Accessed 22th October 2014].
- JANKO, C., LINKE, S., ROMIG, T., THOMA, D., SCHROEDER, W. & KOENIG, A. 2011. Infection pressure of human alveolar echinococcosis due to village and small town foxes (*Vulpes vulpes*) living in close proximity to residents. *European Journal of Wildlife Research*, 57, 1033-1042.
- JENKINS, D. J. 1998. Hydatidosis -- a zoonosis of unrecognised increasing importance? *J Med Microbiol*, 47, 281-2.
- JENKINS, D. J. & MACPHERSON, C. N. 2003. Transmission ecology of *Echinococcus* in wild-life in Australia and Africa. *Parasitology*, 127 Suppl, S63-72.
- JENKINS, D. J., ROMIG, T. & THOMPSON, R. C. A. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.- a global update. *International Journal for Parasitology*, 35, 1205-1219.
- JENKINS, E. J., SCHURER, J. M. & GESY, K. M. 2011. Old problems on a new playing field: Helminth zoonoses transmitted among dogs, wildlife, and people in a changing northern climate. *Veterinary Parasitology*, 182, 54-69.
- JIMENEZ, S., PEREZ, A., GIL, H., SCHANTZ, P. M., RAMALLE, E. & JUSTE, R. A. 2002. Progress in control of cystic echinococcosis in La Rioja, Spain: decline in infection prevalences in human and animal hosts and economic costs and benefits. *Acta Tropica*, 83, 213-221.

- KACHANI, M. & HEATH, D. 2014. Dog population management for the control of human echinococcosis. *Acta Trop*, 139c, 99-108.
- KACHANI, M., MACPHERSON, C. N. L., LYAGOUBI, M., BERRADA, M., BOUSLIKHANE, M., KACHANI, F. & EL HASNAOUI, M. 2003. Public health education/importance and experience from the field. Educational impact of community-based ultrasound screening surveys. *Acta Tropica*, 85, 263-269.
- KANAGAL, D. V. & HANUMANALU, L. C. 2010. Hydatid cyst of urinary bladder associated with pregnancy:a case report. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 282, 29-32.
- KERN, P., AMMON, A., KRON, M., SINN, G., SANDER, S., PETERSEN, L. R. & GAUS, W. 2004. Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 2088-2093.
- KERSTING, A. L., MEDEIROS, L. C. & LEJEUNE, J. T. 2009. Zoonoses and the Physicians' Role in Educating Farming Patients. *Journal of Agromedicine*, 14, 306-311.
- KUMAR, S., SINGLA, S., SINGH, N. & GUPTA, P. 2010a. Primary ovarian echinococcosis mimicking an ovarian carcinoma: an uncommon masquerade even in the developing world. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*, 89, 1495-1496.
- KUMAR, S., VERMA, S. K. & SINGH, P. 2010b. MULTISYSTEM INVOLVEMENT OF HYDATID CYST. *Veterinary Practitioner*, 11, 7-8.
- LAHMAR, S., BOUFANA, B. S., INOUBLI, S., GUADRAOUI, M., DHIBI, M., BRADSHAW, H. & CRAIG, P. S. 2009. Echinococcus in the wild carnivores and stray dogs of northern Tunisia: the results of a pilot survey. *Ann Trop Med Parasitol*, 103, 323-31.
- LAHMAR, S., TRIFI, M., BEN NACEUR, S., BOUCHHIMA, T., LAHOUAR, N., LAMOUCI, I., MAAMOURI, N., SELMI, R., DHIBI, M. & TORGERSON, P. R. 2013. Cystic echinococcosis in slaughtered domestic ruminants from Tunisia. *Journal of Helminthology*, 87, 318-325.
- LARRIEU, E., HERRERO, E., MUJICA, G., LABANCHI, J. L., ARAYA, D., GRIZMADO, C., CALABRO, A., TALMON, G., RUESTA, G., PEREZ, A., GATTI, A., SANTILLAN, G., CABRERA, M., AREZZO, M., SELEIMAN, M., CAVAGION, L., CACHAU, M. G., ALVAREZ ROJAS, C. A., GINO, L., GAUCI, C. G., HEATH, D. D., LAMBERTI, R. & LIGHTOWLERS, M. W. 2013. Pilot field trial of the EG95 vaccine against

- ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: early impact and preliminary data. *Acta Trop*, 127, 143-51.
- LAVIKAINEN, A., LEHTINEN, M. J., MERI, T., HIRVELA-KOSKI, V. & MERI, S. 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 127, 207-215.
- MA, S. M., MAILLARD, S., ZHAO, H. L., HUANG, X., WANG, H., GENG, P. L., BART, J. M. & PIARROUX, R. 2008. Assessment of *Echinococcus granulosus* polymorphism in Qinghai Province, People's Republic of China. *Parasitology Research*, 102, 1201-1206.
- MACPHEE, R. D. E. & GREENWOOD, A. D. 2013. Infectious disease, endangerment, and extinction. *International journal of evolutionary biology*, 2013, 571939-571939.
- MACPHERSON, C. N. 1983. An active intermediate host role for man in the life cycle of *Echinococcus granulosus* in Turkana, Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 32, 397-404.
- MACPHERSON, C. N. L. 2005. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35, 1319-1331.
- MAGALHÃES, R. & MATEUS, T. 2012. Desparasitação interna de cães - o que sabem os proprietários de Ponte de Lima? *Acta Parasitológica Portuguesa*, 19, 253.
- MAGAMBO, J., NJOROGI, E. & ZEYHLE, E. 2006. Epidemiology and control of echinococcosis in sub-Saharan Africa. *Parasitology International*, 55, S193-S195.
- MANDAL, S. & MANDAL, M. D. 2012. Human cystic echinococcosis: epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5, 253-260.
- MANI, I. & MAGUIRE, J. H. 2009. Small Animal Zoonoses and Immunocompromised Pet Owners. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24, 164-174.
- MARKANDYA, A., TAYLOR, T., LONGO, A., MURTY, M. N., MURTY, S. & DHAVALA, K. 2008. Counting the cost of vulture decline - An appraisal of the human health and other benefits of vultures in India. *Ecological Economics*, 67, 194-204.
- MARTIN-HERNANDO, M. P., GONZALEZ, L. M., RUIZ-FONS, F., GARATE, T. & GORTAZAR, C. 2008. Massive presence of *Echinococcus granulosus*

- (Cestoda, Taeniidae) cysts in a wild boar (*Sus scrofa*) from Spain. *Parasitology Research*, 103, 705-707.
- MAS-COMA, S., VALERO, M. A. & BARGUES, M. D. 2008. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Rev Sci Tech*, 27, 443-57.
- MATHIS, A. & DEPLAZES, P. 2006. Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitology International*, 55, S87-S90.
- MCMANUS, D. P. 2013. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology*, 140, 1617-1623.
- MCMANUS, D. P. & THOMPSON, R. C. A. 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*, 127, S37-S51.
- MCMANUS, D. P., ZHANG, W., LI, J. & BARTLEY, P. B. 2003. Echinococcosis. *The Lancet*, 362, 1295-1304.
- METWALLY, A. M., IBRAHIM, N. A., SAAD, A. & EL-ELA, M. H. A. 2006. Improving the roles of rural women in health and environmental issues. *International Journal of Environmental Health Research*, 16, 133-144.
- MORAES E COSTA, M. 1897. *Duas palavras sobre os kystos hydáticos do fígado e seu tratamento*. Licenciatura, Escola Medico-Cirurgica do Porto.
- MORETTI, B., PANELLA, A., MORETTI, L., GAROFALO, R. & NOTARNICOLA, A. 2010. Giant primary muscular hydatid cyst with a secondary bone localization. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, E192-E195.
- MORO, P. & SCHANTZ, P. M. 2006. Cystic echinococcosis in the Americas. *Parasitology International*, 55, S181-S186.
- MORO, P. & SCHANTZ, P. M. 2009. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis*, 13, 125-33.
- MUNYEME, M., MUMA, J. B., MUNANG'ANDU, H. M., KANKYA, C., SKJERVE, E. & TRYLAND, M. 2010. Cattle owners' awareness of bovine tuberculosis in high and low prevalence settings of the wildlife-livestock interface areas in Zambia. *Bmc Veterinary Research*, 6.
- MWAMBETE, K. D., PONCE-GORDO, F. & CUESTA-BANDERA, C. 2004. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica*, 91, 87-93.
- NAKAO, M., LAVIKAINEN, A., YANAGIDA, T. & ITO, A. 2013. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology*, 43, 1017-1029.
- NJOROGE, E. M., MBITHI, P. M., GATHUMA, J. M., WACHIRA, T. M., MAGAMBO, J. K. & ZEYHLE, E. 2000. Application of ultrasonography in prevalence studies of

- hydatid cysts in goats in north-western Turkana, Kenya and Toposaland, southern Sudan. *Onderstepoort J Vet Res*, 67, 251-5.
- NOTARNICOLA, A., PANELLA, A., MORETTI, L., SOLARINO, G. & MORETTI, B. 2010. Hip joint hydatidosis after prosthesis replacement. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, E287-E290.
- OIE 2014. OIE Listed Diseases. Available: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>. [Accessed 22th October 2014].
- ONAC, D., GYORKE, A., OLTEAN, M., GAVREA, R. & COZMA, V. 2013. First detection of Echinococcus granulosus G1 and G7 in wild boars (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) in Romania using PCR and PCR-RFLP techniques. *Veterinary Parasitology*, 193, 289-291.
- OTERO-ABAD, B. & TORGERSON, P. R. 2013. A systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2249.
- OUERGHI, S., ABDELHAFIDH, K., MERGHLI, A., SMATI, B., BOUDAYA, M. S., LAMINE, K., MESTIRI, T. & KILANI, T. 2010. Iatrogenic gas embolism after use of hydrogen peroxide in the treatment of lung hydatid cyst: a report of 2 cases. *Tunis Med*, 88, 851-4.
- OZCAN, S., KARAYALCIN, R. & OZYER, S. 2010. Large solitary paravaginal hydatid cyst: a rare cause of urethral injury. *International Urogynecology Journal*, 21, 1577-1579.
- OZKOL, M., KILIMCIOGLU, A. A., GIRGINKARDESLER, N., BALCIOGLU, I. C., SAKRU, N., KORKMAZ, M. & OK, U. Z. 2005. A discrepancy between cystic echinococcosis confirmed by ultrasound and seropositivity in Turkish children. *Acta Tropica*, 93, 213-216.
- PACHECO, S. M. S. 1889. *Breve estudo sobre o diagnóstico e tratamento dos kystos hydáticos do fígado*. Licenciatura, Escola Medico-Cirurgica do Porto.
- PAPAZAHARIADOU, A., FOUNTA, A., PAPADOPOULOS, E., CHLIOUNAKIS, S., ANTONIADOU-SOTIRIADOU, K. & THEODORIDES, Y. 2007. Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Veterinary Parasitology*, 148, 170-173.
- PESTANA, H. M. & GAGEIRO, J. N. 1998. *Análise de dados para as ciências sociais - a complementaridade do SPSS*, Lisboa, Lisboa Sílabo.
- PETRIGH, R. S. & FUGASSA, M. H. 2013. DNA extraction and a cost-effective detection method for Echinococcus granulosus protoscoleces. *Veterinary Parasitology*, 198, 410-413.

- PFUKENYI, D. M., CHIPUNGA, S. L., DINGINYA, L. & MATENGA, E. 2010. A survey of pet ownership, awareness and public knowledge of pet zoonoses with particular reference to roundworms and hookworms in Harare, Zimbabwe. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 247-252.
- PIERANGELI, N. B., SONIANO, S. V., ROCCIA, I., GIMENEZ, J., LAZZARINI, L. E., GRENOVERO, M. S., MENESTRINA, C. & BASUALDO, J. A. 2007. Heterogeneous distribution of human cystic echinococcosis after a long-term control program in Neuquen, Patagonia Argentina. *Parasitology International*, 56, 149-155.
- PINTO, C. S., ROSA, M. V., NASCIMENTO, M. L. P. R. & BORDALO, A. 2014. Doenças de Declaração Obrigatória 2009 - 2012. Lisboa: Direcção Geral da Saúde.
- PINTO, V., SOEIRO, V., OLIVEIRA, H. & VALENTE, A. Foxes at our doorstep. Urban foxes in Vila Nova de Gaia. In: ELSEVIER, ed. 4th Meeting of Young Researchers at UP., 2011 Porto - Portugal. 560.
- RANGEL, A. T. 1900. *Kystos hydatikos primitivos da pleura*. Licenciatura, Escola Medico-Cirurgica do Porto.
- REIS, T., VILARES, A., FERREIRA, I., MARTINS, S., FURTADO, C. & GARATÉ, M. J. 2014. Hidatidose quística humana: análise retrospectiva de casos notificados e em monitorização entre 2008 e 2013. Boletim Epidemiológico Observações. INSA. 3(8):30-33.
- RINALDI, F., BRUNETTI, E., NEUMAYR, A., MAESTRI, M., GOBLIRSCH, S. & TAMAROZZI, F. 2014. Cystic echinococcosis of the liver: A primer for hepatologists. *World J Hepatol*, 6, 293-305.
- RINALDI, L., MAURELLI, M. P., CAPUANO, F., PERUGINI, A. G., VENEZIANO, V. & CRINGOLI, S. 2008. Molecular update on cystic echinococcosis in cattle and water buffaloes of southern Italy. *Zoonoses and Public Health*, 55, 119-123.
- ROBERTS, L. S. & JANOVY, J. J. 2009. *Foundations of parasitology*, New York, McGraw-Hill. 8thEd. 313-367pp.
- ROBERTSON, I. D. & THOMPSON, R. C. 2002. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microbes and Infection*, 4, 867-873.
- ROJAS, C. A. A., ROMIG, T. & LIGHTOWLERS, M. W. 2014. Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans - review of current knowledge. *International Journal for Parasitology*, 44, 9-18.

- ROJO-VAZQUEZ, HENANDEZ, S. R., NAVARRETE, L. C., ALUNDA, R., GUITIERREZ, G., MORRONGO, P. & ALONSO DE VEGA, F. D. 2003. *Enfermedades parasitarias del ganado ovino y caprino*.
- ROMIG, T., DINKEL, A. & MACKENSTEDT, U. 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int*, 55 Suppl, S187-91.
- SADJADI, S. M. 2006. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitology International*, 55, S197-S202.
- SADJJADI, S. M., MIKAEILI, F., KARAMIAN, M., MARAGHI, S., SADJJADI, F. S., SHARIAT-TORBAGHAN, S. & KIA, E. B. 2013. Evidence that the *Echinococcus granulosus* G6 genotype has an affinity for the brain in humans. *International Journal for Parasitology*, 43, 875-877.
- SARIOZKAN, S. & YALCIN, C. 2009. Estimating the production losses due to cystic echinococcosis in ruminants in Turkey. *Veterinary Parasitology*, 163, 330-334.
- SAVIOLI, L. & DAUMERIE, D. 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organization. Available: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf. [Accessed 22th October 2014].
- SCALA, A., GARIPPA, G., VARCASIA, A., TRANQUILLO, V. M. & GENCHI, C. 2006. Cystic echinococcosis in slaughtered sheep in Sardinia (Italy). *Veterinary Parasitology*, 135, 33-38.
- SCALA, A. & MAZZETTE, R. 2009. Cystic echinococcosis in the sheep: causes of its persistence in Sardinia. *Veterinary Research Communications*, 33, S41-S45.
- SCHNEIDER, R., GOLLACKNER, B., EDEL, B., SCHMID, K., WRBA, F., TUCEK, G., WALOCHNIK, J. & AUER, H. 2008. Development of a new PCR protocol for the detection of species and genotypes (strains) of *Echinococcus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *International Journal for Parasitology*, 38, 1065-1071.
- SCHNEIDER, R., GOLLACKNER, B., SCHINDL, M., TUCEK, G. & AUER, H. 2010. *Echinococcus canadensis* G7 (Pig Strain): An Underestimated Cause of Cystic Echinococcosis in Austria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 871-874.
- SCHURER, J., SHURY, T., LEIGHTON, F. & JENKINS, E. 2013. Surveillance for *Echinococcus canadensis* genotypes in Canadian ungulates. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife*, 2, 97-101.

- SEIMENIS, A. 2003. Overview of the epidemiological situation on echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta Tropica*, 85, 191-195.
- SHAMIM, M. 2010. Mammary and femoral hydatid cysts. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 60, 687-688.
- SHUKLA, R. M., MUKHOPADHYAY, M., MANDAL, K. C. & MUKHOPADHYAY, B. 2010. Giant congenital infected splenic cyst: An interesting case report and review of the literature. *Indian Journal of Surgery*, 72, 260-262.
- SINGH, B. B., DHAND, N. K., GHATAK, S. & GILL, J. P. S. 2014. Economic losses due to cystic echinococcosis in India: Need for urgent action to control the disease. *Preventive Veterinary Medicine*, 113, 1-12.
- SINGH, I., TUCKER, L. A., GENDALL, P., RUTHERFURD-MARKWICK, K. J., CLINE, J. & THOMAS, D. G. 2011. Age, breed, sex distribution and nutrition of a population of working farm dogs in New Zealand: results of a cross-sectional study of members of the New Zealand Sheep Dog Trial Association. *N Z Vet J*, 59, 133-8.
- SLOVIC, P., PETERS, E., FINUCANE, M. L. & MACGREGOR, D. G. 2005. Affect, risk, and decision making. *Health Psychology*, 24, S35-S40.
- SNABEL, V., ALTINTAS, N., D'AMELIO, S., NAKAO, M., ROMIG, T., YOLASIGMAZ, A., GUNES, K., TURK, M., BUSI, M., HUETTNER, M., SEVCOVA, D., ITO, A. & DUBINSKY, P. 2009. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitology Research*, 105, 145-154.
- SOBRINO, R., GONZALEZ, L. M., VICENTE, J., DE LUCO, D. F., GARATE, T. & GORTAZAR, C. 2006. Echinococcus granulosus (Cestoda, Taeniidae) in the Iberian wolf. *Parasitology Research*, 99, 753-756.
- SOMOCURCIO, J. R., SANCHEZ, E. L., NAQUIRA, C., SCHILDER, J., ROJAS, F., CHACON, P. & YABAR, A. 2004. First report of a human case of polycystic echinococcosis due to Echinococcus vogeli from neotropical area of Peru, South America. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 46, 41-2.
- SOTIRAKI, S., HIMONAS, C. & KORKOLIAKOU, P. 2003. Hydatidosis-echinococcosis in Greece. *Acta Tropica*, 85, 197-201.
- STAERK, K. D. C., ALONSO, S., DADIOS, N., DUPUY, C., ELLERBROEK, L., GEORGIEV, M., HARDSTAFF, J., HUNEAU-SALAUEN, A., LAUGIER, C., MATEUS, A., NIGSCH, A., AFONSO, A. & LINDBERG, A. 2014. Strengths and weaknesses

- of meat inspection as a contribution to animal health and welfare surveillance. *Food Control*, 39, 154-162.
- STULL, J. W., CARR, A. R., CHOMEL, B. B., BERGHAUS, R. D. & HIRD, D. W. 2007. Small animal deworming protocols, client education, and veterinarian perception of zoonotic parasites in western Canada. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, 48, 269-276.
- TAYLOR, L. H., LATHAM, S. M. & WOOLHOUSE, M. E. J. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 356, 983-989.
- TAYLOR, M. A., COOP, R. L. & WALL, R. L. 2007. *Veterinary Parasitology*, Wiley Blackwell Publishing. 3rd Ed. 904pp.
- THEVENET, P. S., JENSEN, O., DRUT, R., CERRONE, G. E., GRENOVERO, M. S., ALVAREZ, H. M., TARGOVNIK, H. M. & BASUALDO, J. A. 2005. Viability and infectiousness of eggs of *Echinococcus granulosus* aged under natural conditions of inferior and climate. *Veterinary Parasitology*, 133, 71-77.
- THIENPONT, D., ROCHETTE, F. & VANPARIJS, O. F. J. 1986. *Diagnosing Helminthiasis by Coprological Examination. Coprological Examination* Beerse, Belgium Janssen Research Foundation. 2nd Ed. 205pp.
- THOMPSON, R. C. & JENKINS, D. J. 2014. *Echinococcus* as a model system: biology and epidemiology. *Int J Parasitol.*
- THOMPSON, R. C. A. 2008. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Experimental Parasitology*, 119, 439-446.
- THOMPSON, R. C. A. 2013. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology*, 43, 1079-1088.
- THOMPSON, R. C. A., KUTZ, S. J. & SMITH, A. 2009. Parasite Zoonoses and Wildlife: Emerging Issues. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6, 678-693.
- THOMPSON, R. C. A. & MCMANUS, D. P. 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology*, 18, 452-457.
- TODOROV, T. & BOEVA, V. 1999. Human echinococcosis in Bulgaria: a comparative epidemiological analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 77, 110-118.
- TORGERSON, P. R. 2003. Economic effects of echinococcosis. *Acta Tropica*, 85, 113-118.
- TORGERSON, P. R. 2006a. Canid immunity to *Echinococcus* spp.: impact on transmission. *Parasite Immunology*, 28, 295-303.

- TORGERSON, P. R. 2006b. Mathematical models for the control of cystic echinococcosis. *Parasitology International*, 55, S253-S258.
- TORGERSON, P. R. & BUDKE, C. M. 2003. Echinococcosis - an international public health challenge. *Research in Veterinary Science*, 74, 191-202.
- TORGERSON, P. R. & DEPLAZES, P. 2009. Echinococcosis: diagnosis and diagnostic interpretation in population studies. *Trends in Parasitology*, 25, 164-170.
- TORGERSON, P. R. & HEATH, D. D. 2003. Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 127, S143-S158.
- TORGERSON, P. R., KARAEVA, R. R., CORKERI, N., ABDYJAPAROV, T. A., KUTTUBAEV, O. T. & SHAIKENOV, B. S. 2003. Human cystic echinococcosis in Kyrgyzstan: an epidemiological study. *Acta Tropica*, 85, 51-61.
- TORGERSON, P. R. & MACPHERSON, C. N. L. 2011. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Veterinary Parasitology*, 182, 79-95.
- UMHANG, G., RICHOMME, C., HORMAZ, V., BOUCHER, J.-M. & BOUE, F. 2014. Pigs and wild boar in Corsica harbor *Echinococcus canadensis* G6/7 at levels of concern for public health and local economy. *Acta Tropica*, 133, 64-68.
- VARCASIA, A., CANU, S., KOGKOS, A., PIPIA, A. P., SCALA, A., GARIPPA, G. & SEIMENIS, A. 2007. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of peloponnesus, Greece. *Parasitology Research*, 101, 1135-1139.
- VARCASIA, A., CANU, S., LIGHTOWLERS, M. W., SCALA, A. & GARIPPA, G. 2006. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitology Research*, 98, 273-277.
- VIEIRA-PINTO, M. M., MATEUS, T., GARGATÉ, M. J., VILARES, A., FERREIRA, I., COELHO, C. & RODRIGUES, M. *First identification of Echinococcus ortleppi in free living wild boar (Sus scrofa) from Portugal. In: INTERNATIONAL, W., ed. VI International Symposium on Wild Fauna, 2011 Edinburgh - UK.*
- WARRINER, K. & NAMVAR, A. 2009. What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in Food Science & Technology*, 20, 245-254.
- WIEDMANN, M. 2003. ADSA foundation scholar award - An integrated science-based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. *Journal of Dairy Science*, 86, 1865-1875.
- ZAJAC, A. M. & CONBOY, G. A. 2012. *Veterinary Clinical Parasitology*, Wiley Blackwell. Ames, Iowa, USA. 8thEd. 368pp.
- ZHANG, W., ZHANG, Z., SHI, B., LI, J., YOU, H., TULSON, G., DANG, X., SONG, Y., YIMITI, T., WANG, J., JONES, M. K. & MCMANUS, D. P. 2006. Vaccination of

- dogs against *Echinococcus granulosus*, the cause of cystic hydatid disease in humans. *J Infect Dis*, 194, 966-74.
- ZHANG, W., ZHANG, Z., WU, W., SHI, B., LI, J., ZHOU, X., WEN, H. & MCMANUS, D. P. 2014. Epidemiology and control of echinococcosis in central Asia, with particular reference to the People's Republic of China. *Acta Trop.* Article in Press.
- ZHANG, W. B., LI, J. & MCMANUS, D. P. 2003. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (1): 18-36.
- ZHANG, W. B. & MCMANUS, D. P. 2006. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 47, 24-41.
- ZHANG, W. B. & MCMANUS, D. P. 2008. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*: a means to control hydatid disease? *Trends in Parasitology*, 24, 419-424.
- ZIADINOV, I., MATHIS, A., TRACHSEL, D., RYSMUKHAMBETOVA, A., ABDYJAPAROV, T. A., KUTTUBAEV, O. T., DEPLAZES, P. & TORGERSON, P. R. 2008. Canine echinococcosis in Kyrgyzstan: Using prevalence data adjusted for measurement error to develop transmission dynamics models. *International Journal for Parasitology*, 38, 1179-1190.