



Universidade Nova de Lisboa



Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudo preliminar para estimativa da prevalência e distribuição de infeções e coinfeções, aparentes e não aparentes, causadas por helmintas em animais abatidos em matadouros de Portugal.

Cláudio André Martins Roque

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciências Biomédicas
Especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional.

Outubro, 2012



Universidade Nova de Lisboa



Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudo preliminar para estimativa da prevalência e distribuição de infeções e coinfeções, aparentes e não aparentes, causadas por helmintas em animais abatidos em matadouros de Portugal.

Cláudio André Martins Roque

Licenciado em Análises Clínicas e de Saúde Pública

Orientadora: Professora Doutora Isabel Maurício

Co orientadora: Professora Doutora Silvana Belo

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Maurício e da Professora Doutora Silvana Belo.

Apoio financeiro da FCT no âmbito do Projeto Estratégico PEst-OE/SAU/UI0074/2011 da UPMM.

Outubro, 2012

Agradecimentos

A realização deste trabalho é o culminar de dois anos extraordinários, que contribuíram imenso para a minha evolução a nível científico e profissional. Tive a oportunidade de me cruzar com pessoas extraordinárias que me transmitiram conhecimentos permitindo assim que alargasse os meus horizontes, e a todas elas o meu mais sincero agradecimento:

À minha Orientadora, Professora Doutora Isabel Maurício e à Professora Doutora Silvana Belo pelo conhecimento partilhado comigo, pelos ensinamentos e pela disponibilidade demonstrada ao longo da realização deste trabalho.

A toda a Unidade de Helmintologia do IHMT pelo acolhimento que me deram durante a realização deste trabalho.

Aos serviços veterinários dos matadouros de Leiria e Pedrogão Grande pelo acolhimento e disponibilidade que demonstraram durante o processo de recolha de amostras.

À Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, na pessoa da Professora Doutora Paula Sapeta, do Professor Doutor Francisco Rodrigues e de todos os funcionários, pela cedência de instalações para a realização de parte deste trabalho, pelos conselhos e pelo apoio que senti por parte desta Instituição. Relembrando sempre que o início do percurso por mim realizado foi nesta escola.

Aos meus pais, pela educação e valores que me transmitiram, sem ela não teria chegado até aqui.

Aos meus tios José e Simone por toda a hospitalidade e apoio que me deram ao longo dos últimos dois anos.

A todos os meus amigos e colegas que de modo direto ou indireto me ajudaram, me deram apoio e força para continuar a lutar pelos meus sonhos sabendo que no final tudo iria correr bem, e que este trabalho seria de facto possível.

Aos amigos José Gabriel, Jorge Riscado, Joana Lourenço e Tiago Barata (entre outros) por estarem sempre presentes quando era mais necessário, verdadeiros amigos,

que independentemente das situações sempre tinham uma palavra de conforto e total disponibilidade para ajudar. A eles tenho uma enorme dívida de gratidão e muito obrigado por tudo.

Por fim tenho um agradecimento muito especial a fazer à Mestre Sílvia Beato, por tudo o que fez por mim ao longo destes últimos 4 anos, pelos ensinamentos enquanto professora, pelos conselhos como amiga e pela ajuda como colega. Acima de tudo quero agradecer por ter visto em mim capacidades e qualidades que muita gente duvidada, tendo apostado na minha pessoa. Sem ela isto dificilmente seria possível ou teria o mesmo sabor. O meu muito obrigado.

Resumo

As helmintoses em ovinos e bovinos são provocadas principalmente por parasitas dos filos Platyhelminthes e Nematoda. Atualmente estão espalhadas um pouco por todo o mundo, inclusivamente Portugal, desde o Continente Americano (norte e sul) ao continente Asiático, passando pela Europa e algumas regiões do continente Africano, estando a sua incidência relacionada com locais onde existe uma enorme criação de gado. Apesar de a sua prevalência ser muitas vezes subestimada, estão associados a morbidade e mortalidade animal, levando a perdas económicas em explorações pecuárias, e podem também constituir um problema de saúde pública para humanos, que geralmente são infetados de forma acidental. Este estudo aborda as três espécies principais de helmintas parasitas hepáticos em bovinos e ovinos em Portugal: *E. granulosus*, a *F. hepatica* e o *D. dendriticum*.

O principal objetivo deste estudo é estimar a prevalência destas helmintoses, e a sua distribuição, em animais abatidos em matadouros de Portugal, particularmente em ovinos e bovinos, e perceber se a inspeção visual feita em matadouros é suficientemente eficaz para deteção daqueles parasitas, com possíveis consequências para a saúde pública e para estimação de prevalência.

As amostras estudadas foram fígado e pulmão, obtidas em dois matadouros da Região Centro de Portugal (Leiria e Pedrogão Grande), a partir de ovinos e bovinos aquando do sacrificio do animal. Foi efetuada a extração de DNA e posteriormente a amplificação por PCR do gene mitocondrial COI e das regiões ITS1 e ITS2 com “primers” descritos na literatura (LCO1490/HCO2198, JB2/JB4.5, BD1/4S e Dd58SF1/Dd28SR1). Para aumentar a sensibilidade de deteção de DNA dos 3 parasitas estudados e permitir assim efetuar um diagnóstico diferencial foram desenhados e testados novos “primers”, internos aos existentes na literatura, desenvolvendo assim uma técnica de Nested-PCR. Posteriormente foram purificados e sequenciados alguns produtos de amplificação das reações de PCR com os “primers” descritos na literatura e analisados do ponto de vista filogenético.

Os resultados obtidos indicaram que os “primers” descritos na literatura têm a capacidade de amplificar a região alvo dos parasitas estudados, mesmo na presença de DNA do hospedeiro, e que em nenhuma amostra de ovino e bovino ocorreu a deteção de DNA de quaisquer dos 3 helmintas. A análise filogenética de produtos de PCR obtidos de amostras portuguesas revelou que as sequências obtidas eram muito semelhantes a amostras Europeias e foi encontrado um novo haplótipo para a região ITS1 e ITS2 de *F. hepatica* na amostra Fasc3 e Fasc4, respetivamente. Os dados obtidos indicam que a prevalência de *D. dendriticum* e *E. granulosus* foi estimada entre 0 e 2% (intervalo de confiança de 0.95). Quanto a *F. hepatica*, detetou-se uma prevalência de 1% com uma margem de 0 a 5% (intervalo de confiança de 0.95).

Palavras-chave: Helmintas, *F. hepatica*; *E. granulosus*; *D. dendriticum*; Matadouros, PCR; nested-PCR, epidemiologia molecular, Dicroceliose, Fasciolose, e Hidatidose/Equinococose.

Abstract

Helminthiasis in sheep and cattle are mainly caused by parasites of the phyla Platyhelminthes and Nematoda. These parasites are worldwide spread from the Americas (North and South) to mainland Asia, throughout Europe (including Portugal) and some parts of Africa. Their incidence is related to livestock farms. Although their prevalence is often underestimated, these infections are associated to animal morbidity and mortality, leading to economic losses in livestock, and may also be a major public health problem for humans. This study focused on the three major species of helminths in cattle and sheep in Portugal: *E. granulosus*, *F. hepatica* and *D. dendriticum*.

The aim of this study was to estimate the prevalence of these helminth infections, and their distribution from animals slaughtered in abattoirs from Portugal, particularly in cattle and sheep, and estimate if visual inspections are effective in the detection of those parasites.

The samples studied were from the liver and lungs of sheep and cattle obtained in two slaughterhouses in the Central Region of Portugal (Leiria and Pedrogão Grande) at the time of the slaughter. Genomic DNA was isolated and mitochondrial COI gene, ribosomal ITS1 and ribosomal ITS2 regions amplified by PCR using primers described on literature (LCO1490/HCO2198 and JB2/JB4.5 for COI, and BD1/4S and Dd58SF1/Dd28SR1 for ITS 1 and 2, respectively). To increase the DNA detection sensitivity and to allow differential diagnosis, we designed primers for nested-PCR. Amplification products were purified, sequenced and phylogenetic analyzed in relation to available published sequences.

Results indicated that primers LCO1490/HCO2198 only amplify well the host DNA. The other primer combinations amplified the parasites target region, even in the presence of host DNA, but were not parasite species specific. On the sheep and cattle samples there was no detection of parasite DNA. The phylogenetic analysis of PCR products sequences from adult parasites of *E. granulosus*, *F. hepatica* and *D. dendriticum* revealed that these were similar to others previously found, including samples found in Europe. However, it was found that the collected *F. hepatica* specimen had a new ITS1 and ITS2 region haplotype.

The prevalence rate of *D. dendriticum* and *E. granulosus* was estimated to be around 0 and 2% (confidence level of 0.95). *F. hepatica* prevalence rate calculated was 1% with a margin of error about 0 and 5% (confidence level of 0.95).

Key words: Helminths, *F. hepatica*; *E. granulosus*; *D. dendriticum*, Slaughterhouses, PCR, Nested-PCR, Molecular Epidemiology, Dicrocoeliasis, Fascioliasis, Hidatidosis/Echinococcosis.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Índice.....	V
Lista de Abreviaturas	X
Capítulo I - Introdução.....	1
1 – Introdução Geral.....	2
1.1 – Principais zoonoses provocadas Helminas em gado ovino e bovino.....	2
1.2 – Aspetos económicos.....	4
1.3 – Abate e inspeção de carne em Portugal.....	6
1.3.1 – Matadouros de Leiria e Pedrogão	8
2 – <i>Echinococcus granulosus</i>	9
2.1 – Sistemática.....	9
2.2 – Morfologia	10
2.2.1 – O parasita adulto.....	10
2.2.2 – Embrióforo ou ovo	11
2.2.3 – Hidátide ou quisto hidático.....	12
2.3 – Ciclo biológico.....	13
2.4 – A Equinococose	15
2.5 – A Hidatidose	15
2.5.1 – A Hidatidose Humana	15
2.5.2 – A Hidatidose Animal (ovinos e bovinos).....	16
2.6 – Sintomatologia.....	17
2.6.1 – A Sintomatologia em humanos	17
2.6.2 – A Sintomatologia em ovinos e bovinos.....	17
2.7 – Diagnóstico	18
2.7.1 – Diagnóstico clínico em humanos	18
2.7.2 – Diagnóstico laboratorial tradicional e molecular	19
2.7.3 – Diagnóstico em ovinos e bovinos.....	20
2.8 – Epidemiologia.....	21
2.8.1 – O parasita no mundo	21
2.8.2 – O parasita em Portugal	22

3 – <i>Fasciola hepatica</i>	24
3.1 – Sistemática	24
3.2 – Morfologia	25
3.2.1 – O parasita adulto.....	25
3.2.2 – O ovo.....	26
3.2.3 – O miracídio.....	27
3.2.4 – O esporocisto.....	27
3.2.5 – A rédia.....	27
3.2.6 – A cercária	27
3.2.7 – A metacercária.....	28
3.3 – Ciclo biológico.....	28
3.4 – A Fasciolose.....	31
3.4.1 – A Fasciolose humana	31
3.4.2 – A Fasciolose animal (ovinos e bovinos)	32
3.5 – Sintomatologia.....	33
3.5.1 – A sintomatologia em humanos.....	33
3.5.2 – A sintomatologia em ovinos e bovinos	33
3.6 – Diagnóstico	34
3.6.1 – Diagnóstico clínico em humanos	34
3.6.2 – Diagnóstico laboratorial tradicional e molecular	34
3.6.3 – Diagnóstico em ovinos e bovinos.....	36
3.7 – Epidemiologia	37
3.7.1 – O parasita no mundo	37
3.7.2 – O parasita em Portugal	38
4 – <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	39
4.1 – Sistemática	39
4.2 – Morfologia	40
4.2.1 – O parasita adulto.....	40
4.2.2 – O ovo.....	41
4.3 – Ciclo biológico.....	41
4.4 – A Dicroceliose	44
4.4.1 – A Dicroceliose humana.....	44
4.4.2 – A Dicroceliose animal (ovinos e bovinos).....	44

4.5 – Sintomatologia	45
4.5.1 – A sintomatologia em humanos.....	45
4.5.2 – A sintomatologia em ovinos e bovinos.....	45
4.6 – Diagnóstico	46
4.6.1 – Diagnóstico clínico em humanos	46
4.6.2 – Diagnóstico laboratorial tradicional e molecular	46
4.6.3 – Diagnóstico em ovinos e bovinos.....	47
3.7 – Epidemiologia.....	47
3.7.1 – O parasita no mundo	47
3.7.2 – O parasita em Portugal	49
5 – Técnicas moleculares aplicadas no diagnóstico e estudo da diversidade genética dos parasitas.....	50
5.1 – Polymerase chain reaction	50
5.2 – Restriction fragment length polymorphism - PCR.....	50
5.3 – Random amplification of polymorphic DNA - PCR.....	51
5.4 – Multiplex PCR	52
5.5 – Restriction Real-time PCR.....	52
5.6 – Sequenciação de DNA	52
Capítulo II - Objetivos.....	54
Capítulo III – Materiais e Métodos	57
1 – Recolha de amostras.....	58
2 – Transporte e armazenamento de amostras.....	58
3 – Processamento de amostras.....	59
4 – Extração de DNA	59
5 – Quantificação de DNA.....	60
6 – Técnica de PCR.....	61
6.1 – “Primers” existentes na literatura.....	61
6.2 – Desenho de novos “Primers”	62
6.3 – Otimização da técnica de PCR.....	62
6.3.1 – Otimização de PCR com “Primers” externos.....	62
6.3.2 – Otimização de PCR com “Primers” internos.....	63

6.4 – Teste de sensibilidade da técnica de PCR.....	63
6.4.1 – “Primers” externos	63
6.4.2 – “Primers” internos.....	63
6.5 – Teste de especificidade da técnica de PCR.....	64
6.6 – Amplificação das amostras	64
7 – Eletroforese em gel de agarose.....	64
8 – Purificação e sequenciação dos produtos de PCR.....	65
9 – Análise filogenética das sequências de DNA.....	65
10 – Análise estatística.....	66
Capítulo IV - Resultados	68
1 – As amostras	69
2 – Extração e quantificação de DNA.....	70
3 – Otimização da técnica de PCR.....	71
3.1 – Amplificação do gene COI com os “Primers” LCO1490/HCO2198.....	71
3.2 – Amplificação do gene COI com os “Primers” JB3/JB4.5.....	75
3.3 – Amplificação da região ITS1 com os “Primers” BD1/4S.....	79
3.4 – Amplificação da região ITS2 com os “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1.....	83
4 – Desenvolvimento dos “Primers” internos	87
4.1 – Otimização de PCR com os “Primers” internos.....	89
5 – Sequenciação.....	93
5.1 – Análise das sequências obtidas	94
6 – Análise filogenética.....	94
6.1 – Análise filogenética de Fasc1	95
6.2 – Análise filogenética de Fasc2	99
6.3 – Análise filogenética de Fasc3	103
6.4 – Análise filogenética de Fasc4	108
6.5 – Análise filogenética de Dicro1.....	112
6.6 – Análise filogenética de Eg1	114
6 – Análise de prevalência	117
Capítulo V – Discussão	119
1 – Recolha de amostras.....	120
2 – Extração e quantificação de DNA.....	122

3 – Otimização da Técnica de PCR.....	123
3.1 – Amplificação do gene COI com os “Primers” LCO1490/HCO2198	123
3.2 – Amplificação do gene COI com os “Primers” JB3/JB4.5	124
3.3 – Amplificação da região ITS1 com os “Primers” BD1/4S	125
3.4 – Amplificação da região ITS2 com os “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1	126
4 – Desenvolvimento dos “Primers” internos	127
4.1 – Otimização dos “Primers” internos	127
5 – Sequenciação.....	128
6 – Análise filogenética.....	129
7 – Análise estatística.....	130
Capítulo VI - Conclusões.....	132
Referências Bibliográficas	135
Lista de figuras	147
Lista de tabelas	155
Anexo I	154
Anexo II.....	158
Anexo III	163

Lista de Abreviaturas

μL – Microlitro;

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool;

BSE – Encefalopatia espongiforme Bovina;

cm – Centímetro;

COI – Citocromo c Oxidase sub-unidade 1;

DGADR – Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DNA – Ácido desoxirribonucleico;

dNTP's – Desoxirribonucleótidos Fosfatados;

EDTA – Sal Bissódico do ácido Etileno Diamino Tetra Acético;

ELISA – Enzyme linked Imunosorbent assay;

EUA – Estados unidos da America;

HCl – Ácido Clorídrico;

ITS1 – Internal Transcribed Spacer 1;

ITS2 – Internal Transcribed Spacer 2;

MgCl_2 – Cloreto de Magnésio;

mM – miliMolar;

mm – milímetro;

mtDNA – DNA mitocondrial ;

NaCl – Cloreto de Sódio;

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina;

NCBI – National Center for Biotechnology information;

ND1 – NADH desidrogenase sub-unidade 1;

pb – Pares de bases;

PBS – Tampão fosfato-salino;

PCR – Reação da Polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction);

pH – Potencial Hidrogeniônico;

RAPD – Amplificação aleatória de DNA polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA);

RFLP – Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism);

RNA – Ácido ribonucleico;

rRNA – RNA ribossômico;

Séc. – Século;

TAC – Tomografia Axial Computorizada;

Tampão TAE – Tampão tris-acetato-EDTA;

U – Unidades;

vCJD – Variante da doença de Creutzfeld-Jakob;

WHO/OMS – World Health Organization/Organização Mundial de Saúde.

Capítulo I – Introdução

Capítulo I – Introdução

1 – Introdução Geral

Zoonoses são infeções ou doenças, que podem ser transmitidas naturalmente de animais vertebrados para o homem, estas infeções podem ser adquiridas diretamente através dos animais ou através da ingestão de alimentos contaminados, tendo os animais um papel fundamental para a manutenção destas infeções zoonóticas na natureza (WHO, 2012a).

Estas infeções representam assim um problema de saúde pública, podendo a sua gravidade, no ser humano, variar de infeções assintomáticas a infeções mais graves que em último caso poderão pôr em risco a vida do paciente (WHO, 2012a).

Por sua vez, as zoonoses podem ser de origem bacteriana, viral, fúngica, parasitária ou podem envolver agentes não convencionais, como por exemplo, o agente da encefalopatia espongiforme bovina (BSE), uma doença neurodegenerativa que afeta o gado bovino e passível de transmissão ao homem causando uma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), que em 1987, levou a União Europeia a decretar o embargo ao consumo de carne bovina e seus derivados, proveniente de Inglaterra (WHO, 2012b).

Além de ser um problema de saúde pública, muitas das principais doenças zoonóticas podem prejudicar a produção de alimentos de origem animal e criar obstáculos ao comércio internacional e nacional de produtos de origem animal, devido às elevadas taxas de rejeição de carcaças que ocorre por exemplo em zonas endémicas (WHO, 2012a).

1.1 – Principais Zoonoses provocadas por Helmintas em gado ovino e bovino

A nível mundial, os principais responsáveis pelas helmintoses em pequenos ruminantes e bovinos pertencem aos filos Platyhelminthes (“corpo achatado”) e Nematoda (“corpo redondo”) (Lagares, 2008).

O filo Platyhelminthes inclui duas classes de parasitas com importância médica e veterinária: a classe Trematoda e a classe Cestoda. Os trematodes adultos são importantes em Medicina Veterinária, podem ser encontrados no intestino, ductos biliares, aparelho respiratório, vasos sanguíneos ou outros órgãos dos seus hospedeiros vertebrados, sendo que, as principais espécies que afetam ovinos e bovinos são: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Dicrocoelium dendriticum*. Os cestodes adultos parasitam o intestino de vertebrados e as suas larvas podem parasitar vertebrados ou invertebrados, como é o caso de *Echinococcus granulosus* e de *Taenia saginata* (Lagares, 2008).

O filo Nematoda é mais diverso e possui várias superfamílias de interesse médico e veterinário: *Strongyloidea*, *Trichostrongyloidea*, *Ancylostomatoidea* e *Metastrongyloidea*. O parasita adulto pode ser encontrada no tubo digestivo, aparelho respiratório e nos vasos pulmonares e as principais espécies que afetam bovinos e ovinos são: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides spp.*, *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum* (Lagares, 2008). Este trabalho incidiu sobre as principais espécies de helmintas zoonóticos, frequentemente encontrados no fígado de bovinos e ovinos, e com importância na saúde humana, nomeadamente *E. granulosus*, *F. hepatica* e *D. dendriticum*.

E. granulosus é o cestode responsável pela Hidatidose humana/animal e Equinococose. Em Portugal não estão descritos muitos casos de hidatidose humana, e a maioria das infeções detetadas são achados clínicos, quanto à hidatidose animal esta é muito frequente em ovinos e bovinos e é responsável por inúmeras perdas económicas nas explorações. O parasita tem como hospedeiros definitivos cães domésticos e canídeos silvestres e como hospedeiros intermediários animais vertebrados, tais como: ovinos, bovinos, suínos, caprinos, búfalos, cervídeos, camelídeos e acidentalmente, pode parasitar humanos (Neves *et al.*, 2007; Varcasia *et al.*, 2008 e Rey, 2002). Em Portugal nunca foi realizado nenhum estudo que englobasse todo o país (Beato, 2009), na Europa um estudo semelhante foi realizado na Turquia, em 2009, onde foi detetada uma prevalência de 7,6% em bovinos e 9,1% em ovinos (Kara *et al.*, 2009).

F. hepatica é o trematode responsável pela Fasciolose humana/animal. Em Portugal não estão descritos muitos casos de fasciolose humana, ocorrendo a maioria em crianças que residem em zonas rurais, quanto à fasciolose animal esta é muito

frequente em ovinos e bovinos e provoca inúmeras perdas económicas nas explorações animais. Apresenta uma distribuição cosmopolita sendo mais frequente em regiões pantanosas sujeitas a inundações periódicas, sendo os herbívoros e omnívoros os principais hospedeiros definitivos e eventualmente pode parasitar humanos (Neves *et al.*, 2007 e Rey, 2002). Não existem estudos a nível nacional que incidam sobre este problema de saúde pública, em estudos semelhantes realizados na europa foram detetadas prevalências de até 5.45% em ovinos (Turquia) e 4.42% em bovinos (Turquia) (Kara *et al.*, 2009).

D. dendriticum é o trematode agente etiológico da Dicroceliose humana/animal. Em Portugal este parasita não tem grande relevância clínica em humanos e em animais a patologia pode levar a uma diminuição da produção animal. Este parasita tem um ciclo de vida que envolve dois hospedeiros intermediários (invertebrados), gastrópode e artrópode, respetivamente e um hospedeiro definitivo (ovinos, caprinos, bovinos e leporídeos) podendo acidentalmente infetar humanos (Ekstam, 2011). Em Portugal pouco foi estudado sobre este parasita, no mundo foram detetadas taxas de prevalência em ovinos de 3,85% (Turquia) a 20% (Irão) e em bovinos de 4,67% (Turquia) (Kara *et al.*, 2007 e Ghazani *et al.*, 2008).

1.2 – Aspetos económicos

Para além de representarem um problema de saúde pública em todo o mundo, muitas das principais doenças zoonóticas podem limitar a produção de alimentos de origem animal e criar obstáculos ao comércio internacional de produtos de origem animal (WHO, 2012a).

O gado ovino e bovino criado em pastos entra mais facilmente em contacto com helmintas, em particular em regiões com clima húmido, uma vez infetados podem permanecer assintomáticos, mas também podem sofrer danos (Agnihotri, 2005). Estes parasitas podem provocar alterações ao nível do ecossistema dos animais, nomeadamente, com a saúde das populações, comportamentos de grupo e seleção sexual que de forma indireta podem afetar a saúde individual do animal ou provocar problemas diretamente na saúde do animal, ou seja, atrasos no crescimento, problema

de senilidade, má nutrição, coinfeções, problemas na gravidez e lactação (Ibrahim *et al.*, 2008).

O parasitismo pode, assim, ser encarado como o principal responsável por perdas económicas em explorações de ovinos e bovinos, de forma direta (mortalidades do hospedeiro, diminuição/perdas de produção) ou indireta (custos de tratamentos, controlo e manejo) (Ibrahim *et al.*, 2008 e Agnihotri, 2005).

Portugal é um país que sempre esteve ligado à terra, à agricultura e à criação de gado (bovino e ovino), fazendo isto parte da sua cultura. Para isso muito contribuem as suas características edafoclimáticas que determinam que apenas 27% dos solos do território nacional são passíveis de utilização agrícola, sendo o restante normalmente utilizado para florestas e pastagens. As condições de luminosidade e temperatura em Portugal favorecem a produção de pastagens e forragens, que são fundamentais para a alimentação de ruminantes (Lagares, 2008).

Atualmente os bovinos são explorados em Portugal essencialmente para a produção de leite e carnes de consumo, os quais requerem diferentes sistemas de produção. A produção de carnes de bovino destina-se diretamente ao consumo humano e o leite destina-se maioritariamente à indústria dos laticínios (leite pasteurizado, manteiga, iogurtes, leites em pó, etc.) (Lagares, 2008).

Os ovinos são explorados para a produção de carne, leite e lã. Normalmente é consumida carne de borrego, dividindo-se em borregos de leite ou de canastra, originários de sistemas de produção de leite, borregos de pastagem, originários dos sistemas extensivos de produção de carne, e borregos provenientes de engordas intensivas. O leite tem como finalidade quase exclusiva a sua transformação em queijo e requeijão, com produção esporádica de manteiga. A produção de lã, em Portugal, tem pouca importância, sendo principalmente um subproduto (Lagares, 2008).

Em 2008, existiam em Portugal 1 439 000 bovinos, sendo a região do Alentejo a principal produtora, com aproximadamente 36,6% do efetivo (DGADR, 2009). Nesse mesmo ano os abates de bovinos aprovados para consumo atingiram as 108 540 toneladas correspondentes a 449 442 cabeças, tendo o consumo *per capita* de carne de bovino atingido um valor de 18,8Kg/habitante (DGADR, 2009).

Em relação a ovinos, em 2008, existiam em Portugal 3 145 000 animais, sendo a região do Alentejo a principal produtora, com cerca de 54,2% do efetivo. Nesse mesmo ano foram abatidas cerca de 1 104 945 cabeças o que se traduz em aproximadamente 11 352 toneladas, não existindo uma descrição clara do consumo de carne de ovinos *per capita*, sabe-se apenas que o consumo *per capita* de ovinos e caprinos foi de 2,7 Kg/habitante (DGADR, 2009).

1.3 – Abate e inspeção de carne em Portugal

Os alimentos podem constituir um importante veículo de agressão ambiental ao homem, nesse sentido, a segurança alimentar constitui um dos pilares fundamentais da Saúde Pública (Duarte, 2004).

Na prática, a maioria dos alimentos está sujeita a um controlo sanitário, realizado de forma aleatória ou por amostragem, desde o leite e derivados, ovos, peixe, legumes ou água, sendo que o alimento sujeito a um maior controlo é a carne. O controlo sanitário de carnes é efetuado em várias fases por agentes do estado, desde a vigilância dos animais vivos em exploração, inspeção no abate, desmancha, armazenamento e comercialização, respeitando a legislação (nacional e europeia) em vigor (Duarte, 2004).

Em particular nos ruminantes, equinos e suínos, o exame não é aleatório, e todos os animais que entram na cadeia comercial são inspecionadas, sendo submetidos a triagem e apreciação técnica individual. A inspeção sanitária nos matadouros está atribuída a Médicos Veterinários Inspectores Sanitários das várias Direções de Serviços Veterinários da Direção Geral de Veterinária (Duarte, 2004).

Os objetivos principais são a: manutenção da inocuidade e genuidade da carne, prevenção de zoonoses ocupacionais, proteção ambiental, garantir o bem-estar animal e auxiliar na proteção das explorações animais contra a propagação de patologias e intoxicações. Para além dos perigos físicos (vidros, objetos pessoais, ossos ou resíduos de ferrugem) e químicos (agentes de limpeza, lubrificantes, pesticidas, metais pesados ou micotoxinas) os principais perigos para a saúde do ser humano são biológicos (bactérias, vírus, parasitas, agentes não convencionais, etc.). O Inspetor sanitário é

responsável por cumprir, integralmente, o protocolo de inspeção *ante e post-mortem*, de modo a detetar possíveis indícios de alguns destes perigos e emitir o seu parecer técnico, que poderá levar à rejeição da carcaça ou da carne do animal em questão (Duarte, 2004).

A inspeção *ante-mortem* dos animais consiste na examinação antes do abate, para garantir que o bem-estar animal é respeitado e verificar se existem sinais de algum fator que possa ter implicações negativas no animal ou para a saúde humana. O bem-estar animal visa garantir que o animal é bem tratado desde o transporte da exploração de origem até ao momento do abate, contribuindo assim para a obtenção de um produto final de maior qualidade. A inspeção *post-mortem* compreende a análise das superfícies externas das carcaças e respetivas miudezas, de modo a identificar alguma alteração patológica, esta análise pode ser efetuada através da observação, palpação e/ou incisão de partes da carcaça e respetivas miudezas, e também com a recolha de amostras para futuros testes de diagnóstico laboratorial. Cabendo ao Inspetor sanitário deliberar se a carne cumpre, os requisitos mínimos para consumo humano, caso isso não aconteça a carne deve ser declarada imprópria para consumo (Ex: revelar infeção parasitária, não estiver de acordo com os critérios microbiológicos estabelecidos, revelar a presença de substâncias tóxicas, etc.) (Miguel, 2009). Em ovinos e bovinos a pesquisa de parasitas no fígado e pulmão passa essencialmente pela observação, palpação e incisões nestes órgãos, onde procuram sinais de entrada e/ou deslocamento dos parasitas ou o parasita em si.

Se nas inspeções *ante e post-mortem* o veterinário oficial suspeitar da presença de uma patologia mais severa e infecciosa (por exemplo tuberculose bovina), deve notificar imediatamente a autoridade competente, para que sejam tomadas todas as medidas e precauções necessárias para impedir a propagação do agente infeccioso, sendo que, os resultados das inspeções e dos testes devem ser incluídos nas bases de dados adequadas (Miguel, 2009).

Em ocasiões especiais, nomeadamente quando o veterinário oficial suspeita de algumas patologias (cisticercose, triquinose, tuberculose, brucelose, etc.) pode sugerir a execução de alguns testes laboratoriais, consoante a patologia. No caso dos parasitas estudados a pesquisa é essencialmente feita de forma visual pelo inspetor sanitário (Miguel, 2009).

1.3.1 – Matadouros de Leiria e Pedrogão

Um matadouro é uma empresa do setor alimentar, aprovado e homologado pela autoridade competente, onde são abatidos animais para deles se obterem carnes e outros produtos de origem animal, destinados ao consumo humano. Estes devem ser concebidos e construídos de modo a minimizar a contaminação de carne e as instalações/equipamentos devem ser concebidos de forma a poderem ser limpos com eficácia (Miguel, 2009).

Devem ser constituídos por uma serie de estruturas, desde a abegoaria até à refrigeração e expedição dos produtos finais, bem delimitadas fisicamente de forma a permitir separar as instalações em duas zonas: uma limpa e outra suja. Para além dos requisitos em termos de espaços físicos, devem ser adotadas outras medidas para garantir um produto final de maior qualidade, como por exemplo, a linha de abate deve ter apenas um único sentido (para minimizar o risco de infeções cruzadas entre os diferentes locais da linha de abate), possuir um sistema de desinfeção de utensílios com água à temperatura de 82°C ou possuir camaras frigorificas que possam ser fechadas à chave para armazenamento de carne declarada imprópria para consumo e da carne retida (Miguel, 2009).

Os Matadouros de Leiria e Pedrogão (locais onde se procedeu à recolha de amostras para este estudo), são matadouros do tipo horizontal, ou seja, todas as operações de abate se desenvolvem no mesmo piso, e cumprem as normas estabelecidas pela entidade reguladora. Os animais abatidos provêm de explorações essencialmente da zona centro, do Alentejo e de Lisboa e Vale do Tejo.

São dois locais onde são abatidos pequenos ruminantes (ovinos e caprinos), suínos (adultos e leitões) e bovinos (adultos e jovens) sendo que o fluxo de trabalho do matadouro varia de acordo com o período do ano e com as necessidades dos fornecedores de carne.

2 – *Echinococcus granulosus*:

E. granulosus é o cestode responsável pela Hidatidose humana/animal e Equinococose, tem a capacidade de parasitar diversas espécies animais, tanto domésticas como selvagens, podendo acidentalmente parasitar humanos. O parasita tem como hospedeiros definitivos cães domésticos e canídeos silvestres e como hospedeiros intermediários animais vertebrados, tais como: ovinos, bovinos, suínos, caprinos, búfalos, cervídeos, camelídeos, etc. (Neves *et al.*, 2007; Varcasia *et al.*, 2008 e Rey, 2002).

2.1 – Sistemática

Rodolphi, em 1801, estabeleceu de forma definitiva o género *Echinococcus*, palavra de origem grega em que “echinos” significa ouriço e “Kókkos” vesícula (Andersen *et al.*, 1997 e Jorge, 2000).

Filo: *Platyhelminthes*

Classe: *Cestoidea*

Ordem: *Cyclophyllidea*

Família: *Taeniidae*

Género: *Echinococcus*

Espécie: *Echinococcus granulosus*

Neste momento estão descritas cerca de 16 espécies do género *Echinococcus* (David de Moraes, 1998), das quais apenas 4 são reconhecidas pela OMS (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthus* e *E. vogeli*) e a classificação baseia-se nas diferenças morfológicas nas distintas fases (larvar e adulta) dos seus ciclos de vida (Trinca, 2001 e Eckert *et al.*, 2001).

A análise de amostras precedentes de diversos hospedeiros e/ou diferentes origens geográficas permitiu identificar variações a nível genético e fenotípico, o que levou a que a OMS reconhecesse a existência de variantes intraespecíficas, cada uma designada de estirpe, e classificada de G1 a G10, até que o seu papel biológico, ecológico e epidemiológico fosse clarificado (Eckert *et al.*, 2001). Atualmente, a

identificação de diferentes estirpes deverá ser baseada numa combinação de diversos critérios, nomeadamente: características morfológicas, biológicas, bioquímicas, epidemiológicas e genómicas, recorrendo a técnicas moleculares de análise de DNA (Eckert *et al.*, 1997).

Nos últimos anos com o evoluir das técnicas moleculares começa a existir alguma controvérsia sobre a classificação taxonómica de certas estirpes, pois existem investigadores que consideram que são espécies diferentes e outros que ainda não encontraram evidências para tal, não existindo ainda um consenso (McManus, 2006).

Investigações neste sentido apontam para uma nova classificação do género *Echinococcus*, ou seja, um novo agrupar dos genótipos existentes dando origem a 3 novas espécies (*E. equinus*, *E. ortleppi* e *E. felidis*). A espécie *E. granulosus* passaria a ser constituída pelos genótipos G1, G2, G3, G6, G7, G8, G9 e G10 constituindo a estirpe do leão (*E. felidis*) uma variante desta, ou mesmo uma nova espécie. A estirpe G4 passaria a ser classificada como espécie *E. equinus* e a estirpe G5 passaria a ser classificada como espécie *E. ortleppi* (Thompson, 2008). Outros estudos apontam para a identificação de uma nova espécie, *Echinococcus shiquicus*, recentemente identificado em animais selvagens do planalto oriental do Tibete, sendo que ainda não existem informações suficientes sobre a sua capacidade de infetar humanos (Li *et al.*, 2008).

2.2 – Morfologia

2.2.1 – O parasita adulto

É a mais pequena ténia de interesse médico (Figura 1) e é dividida em 3 secções, a cabeça ou escólex (órgão de fixação), pescoço e tronco ou estróbilo, e poderá apresentar um tamanho de 2 a 8 mm ao contrário dos outros tenídeos que apresentam vários segmentos e até vários metros (Rey, 2002).

O escólex é piriforme e possui na sua extremidade um rostro musculoso, com 30 a 40 ganchos dispostos circularmente em duas camadas; e, na parte mais dilatada, quatro ventosas, sendo estas as principais estruturas de fixação (Rey, 2002).

O pescoço é a parte posterior do escólex, é curto, delgado, e constitui a zona de crescimento dos proglótes (Beato, 2009).

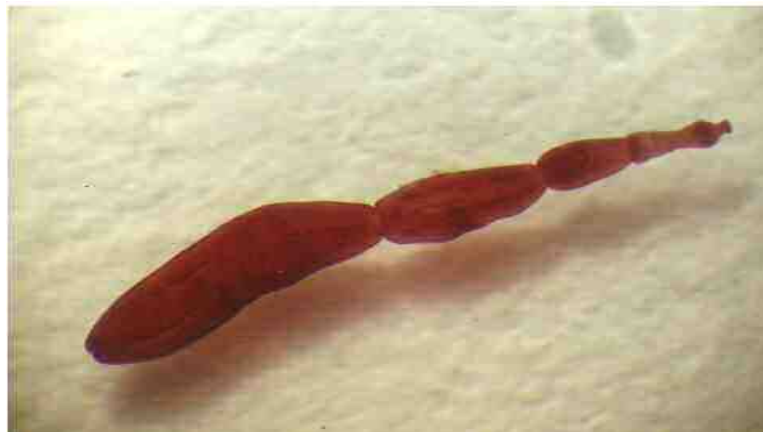


Figura 1: Exemplar do Parasita adulto de *E. granulosus* (Beato, 2009).

O estróbilo é habitualmente composto por 3 segmentos ou proglótes nos quais se distingue a cutícula ou tegumento, o sistema reprodutor e o sistema excretor (Rey, 2002). O sistema reprodutor, está localizado no segundo próglote, e é aí que se desenvolvem os aparelhos sexuais (primeiro o masculino e depois o feminino) (Eckert *et al.*, 2001), sendo um parasita hermafrodita. Após a fecundação os ovos ou embrióforos são armazenados no último segmento do estróbilo, quando ocorre a sua libertação estes são eliminados com as fezes do hospedeiro para o meio envolvente (Rey, 2002).

2.2.2 – Embrióforo ou ovo

Apresenta uma forma ovoide ou ligeiramente elíptica (Figura 2), com um comprimento entre 32 a e 38 μ m e 25 a 35 μ m de largura, e no seu interior contem o embrião que só tem a possibilidade de se desenvolver se o ovo for ingerido por um hospedeiro intermediário ou acidental (Rey, 2002).



Figura 2: Ovo de *E. granulosus* (Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/ech5.jpg>)

2.2.3 – Hidátide ou Quisto hidático

A Hidátide ou Quisto Hidático é constituído por uma série de estruturas: cutícula, membrana germinativa, cápsulas germinativas, protoscólices, vesículas filhas e o líquido hidático.

Estrato laminar ou cutícula: é a estrutura mais externa do metaquisto, isolando-o e protegendo-o dos mecanismos de defesa do hospedeiro e permite a passagem de nutrientes indispensáveis ao desenvolvimento do parasita (David de Moraes, 1998 e Beato, 2009);

Membrana germinativa ou granulosa: reveste interiormente o quisto hidático, é esbranquiçada e bastante delgada. Tem como principais funções promover o próprio crescimento e renovação, assegurar a formação do estrato laminar, elaborar o líquido hidático e garantir a continuidade da espécie através de vesículas prolíferas (David de Moraes, 1998 e Beato, 2009);

Vesícula Prolíferas ou cápsulas germinativas: Originárias da membrana germinativa, no seu interior desenvolvem-se os protoscólices. Com o evoluir da hidátide, estas vesículas vão-se destacando da membrana germinativa e flutuam no líquido hidático, correndo o risco de rebentarem libertando os protoscólices. Estes e as cápsulas germinativas têm tendência a depositarem-se, constituindo a areia hidática (David de Moraes, 1998);

Protoscólices: Representam formas rudimentares ou potenciais de vermes adultos, são os elementos que garantem a perpetuação da espécie e a elevada capacidade de difusão da mesma (David de Moraes, 1998);

Vesículas Filhas, vesículas secundárias ou hidátides filhas: Estruturas que reproduzem inteiramente as hidátides mãe; diferem das vesículas prolíferas devido ao facto de possuírem membrana cuticular envolvente (Beato, 2009);

Líquido hidático: Líquido de preenchimento do quisto hidático no qual se encontram os elementos figurados, como vesículas prolíferas, protoscólices, areia hidática e vesículas filhas. A sua formação advém de secreções e excreções do parasita e de transudados de tecidos do hospedeiro, contendo assim diversos compostos comuns

ao soro do hospedeiro, mas em diferentes concentrações (David de Moraes, 1998; Trinca, 2001 e Eckert *et al.*, 2001).

É também importante referir que todo este conjunto de estruturas se encontra envolvido externamente por uma membrana, a Membrana Adventícia ou periquística, esta estrutura não pertence ao parasita, mas sim ao hospedeiro. Tratando-se assim de uma camada fibrosa externa, advinda da compressão e reação dos tecidos envolventes da hidátide. Com o envelhecimento do quisto hidático há uma tendência para a calcificação desta membrana (Trinca, 2001 e David de Moraes, 1998);

2.3 – Ciclo Biológico

O ciclo de vida de *E. granulosus* é complexo (Figura 3), sendo descrito em geral como compreendendo duas fases capazes de assegurar a multiplicação da espécie e sua propagação, a Fase Sexuada e a Assexuada (larvar) (Rey, 2002).

Fase Sexuada ou Adulta: fase em que a pequena ténia, depois de formar proglótes com os seus órgãos genitais hermafroditas, promove a fecundação e a produção abundante de ovos, o que acontece no intestino delgado dos hospedeiros definitivos. As proglótes grávidas, à medida que se desprendem do estróbilo, são eliminadas com as fezes do hospedeiro definitivo e vão poluir o solo dos campos, a água, o pelo do próprio cão entre outros locais (Rey, 2002). Estudos realizados revelaram que na Península Ibérica o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é o mais importante hospedeiro definitivo deste parasita (David de Moraes, 1998 e Trinca, 2001).

A infeção pode ocorrer quando existe a ingestão acidental dos ovos do parasita, geralmente os hospedeiros intermediários infetam-se ao pastarem ou ao beberem água contaminada. Apesar de todos os mamíferos poderem ser hospedeiros intermediários (ovinos, bovinos, equinos, caprinos, suínos, etc.) os mais afetados são ovinos, existindo registos de animais selvagens parasitados (Dalimiet *et al.*, 2006 e Zanini *et al.*, 2006).

Os humanos podem ser infetados de diversas formas, sendo a principal o contacto próximo com o cão, uma vez que os ovos podem espalhar-se por todo o pelo do animal. Um simples gesto, como a mão passar pelo pêlo do cão leva a que os ovos adiram as mãos, se estas, não forem lavadas, ao serem levadas à boca, o individuo pode

ingerir os ovos e tornar-se num hospedeiro acidental. O homem também pode ser infetado de forma indireta, ao ingerir alimentos que estejam conspurcados com os ovos ou ingerindo bebidas servidas em recipientes contaminados (Andersen *et al.*, 1997).

Quer acidentalmente no homem ou noutros hospedeiros intermediários, após a ingestão de ovos, é dada continuidade ao ciclo de vida do parasita, pois os embriões hexacantos irão dar origem ao quisto hidático (Trinca, 2001).

Fase assexuada ou larvar: fase em que nos tecidos do hospedeiro intermediário ocorre a formação do quisto hidático e cápsulas prolíferas, com grandes quantidades de protoscólices gerados por gemiparidade. Estes representam indivíduos filhos da forma hidátide, capazes de se transformarem em pequenas ténias, se as vísceras parasitadas (dos hospedeiros intermediários) forem ingeridas por um hospedeiro definitivo (Rey, 2002).

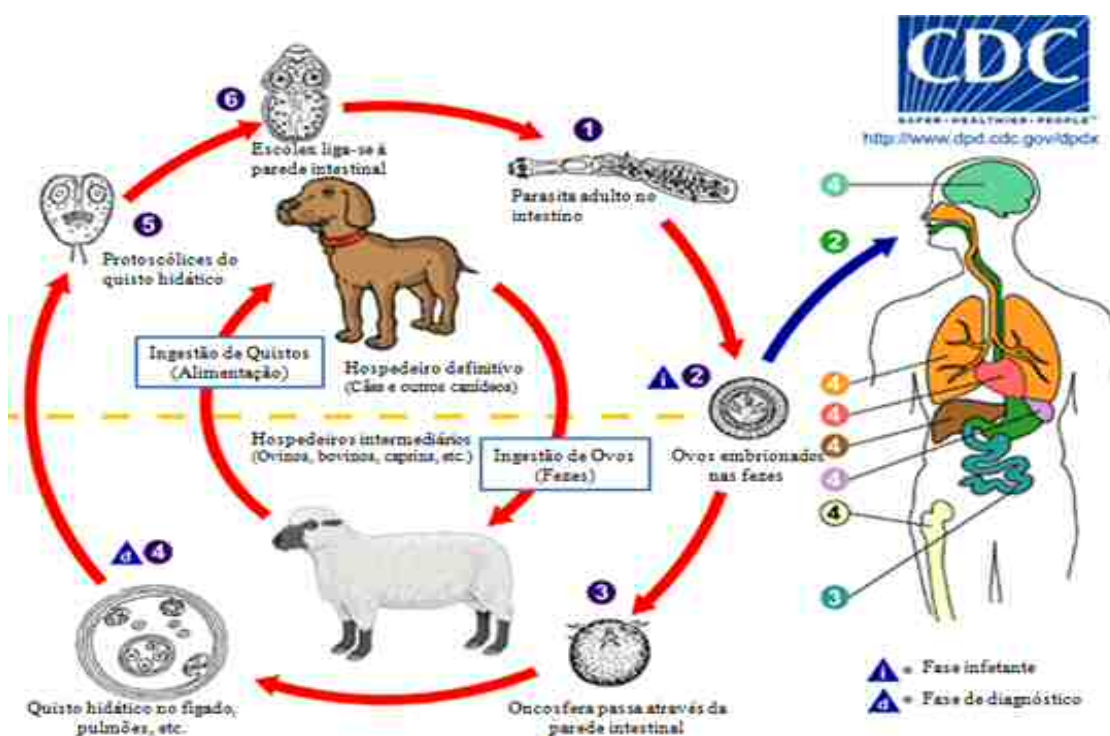


Figura 3: Ciclo biológico de *E. granulosus* (fonte: imagem editada de http://www.dpd.cdc.gov/DPDX/HTML/Frames/AF/Echinococcosis/body_Echinococcosis_page1.htm). 1- O parasita adulto no intestino delgado dos hospedeiros definitivos (libertação das proglotes grávidas). 2- Ovos embrionados são libertados com as fezes para o meio ambiente, onde são ingeridos de forma acidental pelos hospedeiros intermediários. 3- No intestino delgado o ovo liberta a oncosfera que penetra na parede intestinal e migra através do sistema circulatório. 4- Aloja-se em diferentes localizações anatómicas (principalmente no fígado). 5- O hospedeiro definitivo é infetado ao ingerir as vísceras contaminadas, ocorrendo a libertação de protoscólices no intestino. 6- Os parasitas desenvolvem-se e o escólex fixa-se à parede intestinal.

2.4 – A Equinococose

É uma patologia de desenvolvimento crónico (Craig *et al.*, 2007) em que os danos que o parasita, na forma adulta, pode causar limitam-se à zona em que este se fixa no intestino do hospedeiro definitivo, onde poderá levar à necrose das células às quais as ventosas aderem, ou à rutura do epitélio da cripta de liberkühn. Em infeções massivas pode haver a produção excessiva de muco, mas em geral não se costumam observar danos importantes nem reações celulares contra o parasita (Ponce Gordo, 1995).

2.5 – A Hidatidose

2.5.1 – A Hidatidose Humana

No que diz respeito à fase larvar, nenhum outro parasita provoca lesões em tantas localizações anatómicas, no entanto, na maioria das vezes a localização é hepática e/ou pulmonar, havendo sido reportados casos de localização no cérebro, músculo, osso, entre outros órgãos (Grácio *et al.*, 2002 e Vicedomini *et al.*, 2007), sendo que os principais problemas causados por este parasita encontram-se relacionados com o crescimento (aumento de tamanho) dos quistos (Ponce Gordo, 1995).

A patologia pode ser considerada Primária ou Secundária. A forma Primária compreende o desenvolvimento relativamente simples da Hidátide, responsável por alterações anatomopatológicas geralmente silenciosas (Rey, 2002), podendo alcançar dimensões na ordem dos 20 cm (Jorge, 2000). A forma Secundária geralmente é o resultado da rutura de uma Hidátide primária univesicular, potenciando assim a disseminação dos protoscólices contidos na areia hidática pelo organismo, o que poderá provocar a formação de quistos hidáticos secundários (Rey, 2002). Inerente a este processo de rutura dos quistos existe a possibilidade de decorrerem infeções bacterianas secundárias, reações anafiláticas de intensidade variável e inclusive a morte do hospedeiro (Anderson, 1997 e Trinca, 2001).

A nível Bioquímico e metabólico podem existir mudanças em vários sistemas enzimáticos e no metabolismo proteico do hospedeiro, indicando a existência de alterações funcionais do órgão parasitado (Radfar & Iranyar, 2004).

2.5.2 – A Hidatidose Animal (ovinos e bovinos)

Em hospedeiros intermediários, nomeadamente em ovinos e bovinos, o quisto hidático tem um desenvolvimento lento e geralmente demora alguns meses até atingir um tamanho que provoque sintomatologia, por exemplo em ovinos demora cerca de dois anos até atingir dimensões que provoquem sintomas. O parasita atinge as mesmas estruturas anatómicas que no humano, sendo o fígado e pulmões os principais alvos deste parasita (figura 4), tendo também já sido encontrado em outros órgãos internos, sistema nervoso central, ossos e músculos (Eckert, 2001).

Muitas vezes os quistos estão presentes em grande número nos órgãos dos animais parasitados, isto deve-se ao facto de os hospedeiros intermediários estarem em contacto constante com a natureza e com as possíveis fontes de transmissão deste parasita (Eckert, 2001) e tal como nos humanos também nos animais podem surgir infeções bacterianas, oportunistas, reações anafiláticas e algumas mudanças a nível metabólico do órgão parasitado. Todos estes problemas podem traduzir-se em atrasos no crescimento, perda de peso, problemas aquando da gravidez e lactação e em ultimo caso à diminuição do efetivo das explorações levando assim a perdas económicas.



Figura 4: Exemplo de um Quisto hidático no fígado de ovino (Fonte: Beato, 2009)

2.6 – Sintomatologia

2.6.1 – Sintomatologia em humanos

A infecção por *E. granulosus* geralmente é silenciosa, ou seja, assintomática e os pacientes podem “apresentar” os quistos durante toda a vida sem terem a necessidade de recorrerem a assistência médica, devido ao facto de o crescimento do quisto ser muito lento. A maioria dos sintomas relacionados com esta patologia encontram-se associados ao aumento do tamanho dos quistos e conseqüente compressão das estruturas onde estão fixados (Rey, 2002). Sendo o fígado o principal alvo deste parasita, normalmente os principais sintomas associados a este são: dor abdominal, mal-estar gástrico, cólicas hepáticas, aumento da temperatura corporal e icterícia (Beato, 2009).

Os quistos hidáticos secundários não comportam um quadro sintomático próprio, pois determinam uma série de sintomas complexos, em virtude do número, aglomeração e das localizações dos elementos parasitários. Entre os sintomas podem-se destacar: perturbações circulatórias, caquexia hidática, supuração, aumento do tamanho do abdómen ou perturbações funcionais de acordo com o local onde os quistos secundários se fixaram (Rey, 2002).

2.6.2 – Sintomatologia em ovinos e bovinos

Devido ao crescimento lento dos quistos há uma grande probabilidade de a infecção ser assintomática durante toda a vida do hospedeiro intermediário, e tal como em humanos o desenvolvimento de sintomas está relacionado com: o órgão parasitado, o tamanho do quisto, o número de quistos e a sua interação com órgãos adjacentes, nomeadamente, os ductos biliares, sistema vascular e árvore brônquica (Eckert *et al.*, 2001).

Ovinos e bovinos, devido a estarem em contato constante com as fontes de transmissão, geralmente estão parasitados com múltiplos quistos principalmente no fígado e pulmões o que pode agravar o estado de saúde dos animais (Eckert *et al.*, 2001).

2.7 – Diagnóstico

2.7.1 – Diagnóstico clínico em humanos

O diagnóstico clínico do quisto hidático é considerado, geralmente, muito difícil no início do parasitismo, pois a reação provocada pela entrada do parasita no organismo é inaparente e assintomática, se este não se alojar em locais que possam causar lesões graves, o diagnóstico será feito muito mais tarde quando o quisto atinge um volume considerável, ou então poderá ser um achado acidental (Trinca, 2001 e Rey, 2002). No entanto, existem casos em que se pode proceder a um diagnóstico imediato, nomeadamente quando o doente, após um ataque de tosse, expulsa fragmentos de membranas quísticas ou vesículas murchas ou túrgidas, com a expectoração, ou então quando um exame parasitológico revela a presença de areia hidática (Trinca, 2001).

Em áreas endêmicas, assim como em centros de atendimentos aos doentes, a possibilidade de uma etiologia hidática deverá estar presente na abordagem clínica para ser comprovada ou excluída pelos métodos adequados, por isso é muito importante o conhecimento da zona de residência/procedência dos doentes, da sua atividade profissional, dos seus hábitos de vida e da existência de outros casos diagnosticados na família, bem como em alguns vizinhos (Trinca, 2001 e Jorge, 2000).

Outro método auxiliar utilizado para proceder ao diagnóstico desta patologia é a Imagiologia, nomeadamente para identificar quistos de pequeno tamanho localizados nos pulmões, fígado e ossos. Com o avançar das tecnologias foram surgindo diversos exames que contribuem para o diagnóstico desta patologia, tais como: cintilografia, tomografia axial computadorizada (TAC) (Figura 5A), ressonância magnética (RM), ecografia (Figura 5B) ou ultrassonografia (Lewall, 1998 e Yuksel *et al.*, 2007).



Figura 5A: TAC de um quisto hidático calcificado no quadrante superior do abdômen de um homem de 28 anos. **5B:** Ecografia de um quisto hidático no fígado de um homem de 25 anos. Imagens adaptadas de Yuksel *et al.*, 2007.

2.7.2 – Diagnóstico laboratorial tradicional e molecular

Os exames laboratoriais de rotina não permitem, por si só, o diagnóstico da Hidatidose, devido ao crescimento lento dos quistos a maioria das alterações hepáticas apenas é notada em casos extremamente avançados da patologia (Beato, 2009).

O exame parasitológico direto consiste na identificação microscópica dos elementos parasitários. Este tipo de diagnóstico apenas pode ser realizado após uma ruptura ou fissuração do quisto hidático, pois uma punção da hidátide, em condições normais, está contra indicada. Excetuando estes casos, anteriormente referidos, o diagnóstico parasitológico direto da Hidátide é impossível (Beato, 2009).

Os métodos imunológicos também podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial, através da pesquisa de antígenos e/ou anticorpos circulantes (Sunita *et al.*, 2007). As técnicas mais utilizadas no imunodiagnóstico têm sido: Prova de Casoni (em desuso), Reação de fixação do complemento, Imunofluorescência, Difusão dupla, Imunoeletroforese, Aglutinação em látex, Hemaglutinação indireta, Immunoblotting e ELISA. Porém, nem todas se têm mostrado suficientemente sensíveis e específicas (Ponce Gordo, 1995 e Zhang, *et al.*, 2007).

Os métodos moleculares utilizados no diagnóstico e genotipagem baseiam-se na detecção e análise do DNA do parasita, nomeadamente do genoma nuclear e do genoma mitocondrial (mtDNA) (Bowles, *et al.*, 1993 e Singh, 1997). Devido ao mtDNA ser

haploide os haplótipos podem ser determinados de forma menos ambígua e este mtDNA tem a vantagem adicional de não ser sujeito a recombinação interna, simplificando a análise (Nakao, *et al.*, 2000; Nakao, *et al.*, 2007 e Badaraco, *et al.*, 2008). Ao longo dos anos foram utilizadas diversas técnicas de biologia molecular para a identificação e genotipagem da espécie *E. granulosus*, tais como: “Polymerase chain reaction” (PCR), “Restriction fragment length polymorphism” (RFLP), “PCR-RFLP”, “Random amplification of polymorphic DNA” (RAPD-PCR) e sequenciação (ver descrição das técnicas na seção 5 da introdução, na página 50), sendo que a técnica de PCR tem sido aplicada na detecção do parasita em infecções patentes e pré-patentes num hospedeiro definitivo, o cão, em amostras de fezes (Naidich *et al.*, 2006).

2.7.3 - Diagnóstico em ovinos e bovinos

O diagnóstico desta patologia em infecções leves é muitas vezes negligenciado e não é executado, sendo que, habitualmente este diagnóstico apenas é executado após o abate do animal em achados de necropsia através da detecção e identificação de quistos nas estruturas anatómicas que o parasita atinge (Eckert, *et al.*, 2001).

Uma técnica utilizada para o diagnóstico em animais vivos é através de ultrassonografia, que segundo alguns estudos apresenta uma sensibilidade de 54% e especificidade de 97% (Ecker, *et al.*, 2001). O imunodiagnóstico também não é recomendado, uma vez que é uma técnica muito menos sensível e específica para animais do que quando aplicada em humanos (Eckert, *et al.*, 2001).

Técnicas de Biologia molecular como a PCR também são utilizadas, principalmente nos achados de necropsia para o diagnóstico diferencial das diferentes estirpes de *Echinococcus*, dados estes que são muito importantes para estudos de vigilância epidemiológica e prevenção desta parasitose, tanto a nível nacional como internacional (Eckert, *et al.*, 2001).

2.8 – Epidemiologia

2.8.1 – O parasita no mundo

Desde há muito que se sabe que a espécie *E. granulosus* tem uma elevada capacidade de adaptação a hospedeiros, quer definitivos quer intermediários e, assim, a constante introdução de animais domésticos da Europa noutras partes do mundo e vice-versa, tem feito com que a distribuição deste parasita seja alargada (Romig, 2003) e este seja encontrado em regiões onde anteriormente era inexistente (Zanini, *et al.*, 2006a; Zanini, *et al.*, 2006b; Chrieki, 2002 e Raether, *et al.*, 2003).

Este parasita pode ser encontrado em todos os continentes (Figura 6), e a sua disseminação está intimamente relacionado com a exportação e importação de gado ovino e bovino, sendo a infeção mais frequente em regiões onde existem grandes criações de gado e, conseqüentemente, elevado número de cães para guardar os rebanhos (David de Moraes, 1998). A nível mundial a estirpe mais prevalente é a G1, mas, consoante a região do globo podemos encontrar uma maior prevalência de outras estirpes.

Na Europa a Hidatidose/Equinococose encontra-se com uma prevalência relativamente baixa em determinadas regiões (Norte e Centro) e uma prevalência média a elevada nas regiões Sul, Sudoeste e Oriente (Eckert *et al.*, 2001). No Centro da Europa está documentada a existência das estirpes G6 a G10, sendo que a mais comum é a estirpe G6, que tem sido alvo de alguma controvérsia pois esta estirpe está referenciada como não infecciosa para humanos embora já exista bibliografia que contrarie esta informação (Pawlowski & Stefaniak, 2003). No Norte da Europa está referenciada a espécie G10, que apresenta uma baixa infecciosidade em humanos (Lavikainen, *et al.*, 2003; Hirvela-Koski, *et al.*, 2003 e Roming, *et al.*, 2006), as restantes estirpes podem ser encontradas de forma mais ou menos aleatória, não tendo sido referenciado nenhum foco. Em relação ao Sul da Europa e Reino Unido existe documentação de casos esporádicos (Eckert e Deplazes, 2004), estes focos coincidem com a distribuição da estirpe das ovelhas (G1), o que sustenta a tese de esta ser a estirpe com maior infecciosidade para o humano (Jenkins, *et al.*, 2005 e Roming, *et al.*, 2006). Toda a região Mediterrânea é considerada como de elevada endemicidade havendo mais que

um genótipo em circulação (Euzéby, 1991; Casulli, *et al.*, 2008; Carmena, *et al.*, 2008 e Varcasia, *et al.*, 2008).

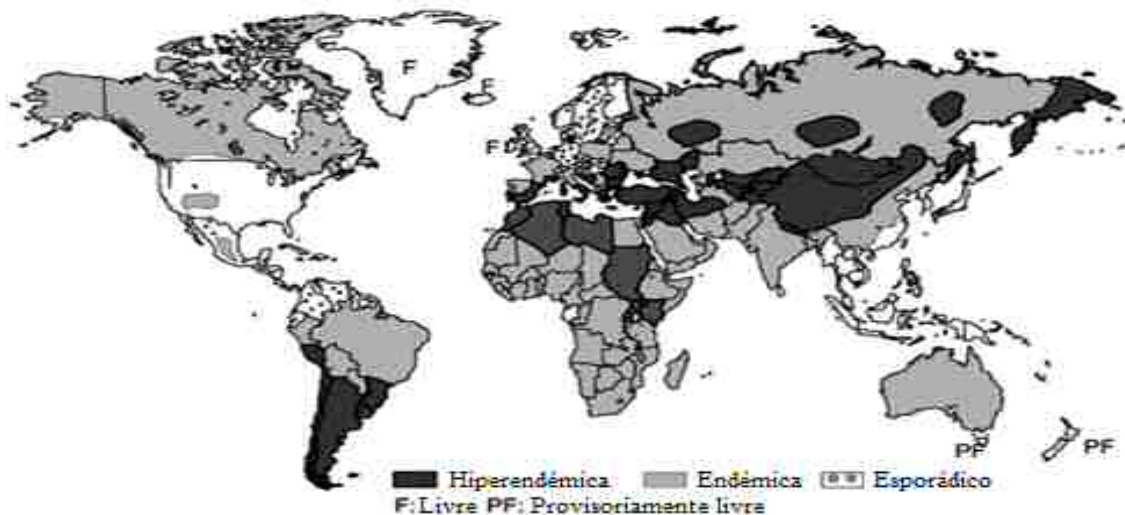


Figura 6: Distribuição mundial de *E. granulosus* (imagem adaptada de (Eckert e Deplazes, 2004).

2.8.2 – O parasita em Portugal

Em Portugal existe documentação sobre esta parasitose desde o Séc. XIX, mas nunca foi realizado nenhum estudo epidemiológico que englobasse todo o país. Diversos estudos foram realizados em algumas regiões continentais, onde foi demonstrado que o ciclo cão/ovino é o maior responsável pela Hidatidose humana em Portugal, não só pela frequência mas também porque os quistos de ovinos são quase sempre férteis, enquanto os quistos provenientes do ciclo cão/bovino são geralmente inférteis (David de Moraes, 1998 e Trinca, 2002).

Um estudo sero-epidemiológico, na região do Alto Alentejo detetou uma prevalência de 3% de positividade para a Hidatidose humana (David de Moraes, 1998), semelhante à detetada no distrito de Castelo Branco (Jorge, 2000), onde se concluiu que a região sul do distrito era considerada hiperendêmica para a Hidatidose humana, segundo as normas da OMS, pois a percentagem de familiares e/ou indivíduos vizinhos de pacientes operados ou com provas serológicas positivas para a hidatidose, era de aproximadamente 3% (Jorge, 2000). Igualmente, o distrito de Évora foi declarado hiperendémico para a Hidatidose humana, a partir de um estudo referente ao período

1979/2003 (David de Morais, 2007), no qual as zonas Norte e Centro de Portugal foram estabelecidas como hipoendémicas e a Região de Lisboa e Vale do Tejo como mesoendémica.

Em relação à Hidatidose animal apresentou índices hidáticos em ovinos, bovinos e suínos abatidos em diversos matadouros nacionais, num período compreendido entre 1944/1968, os quais variam entre 0,3% no distrito de Castelo Branco e 6,2% no distrito do Porto (não tendo sido incluídos neste estudo os matadouros municipais de Lisboa e Porto) (David de Morais, 1998).

3 - *Fasciola hepatica*

F. hepatica é o agente etiológico da Fasciolose humana/animal, e tem a capacidade de parasitar diversas espécies animais, principalmente herbívoros e omnívoros (ovinos, bovinos, caprinos, etc.) onde pode ser encontrado no fígado e canais biliares, tendo também a capacidade, de acidentalmente, infectar o Homem. Apresenta uma distribuição cosmopolita sendo mais frequente em regiões pantanosas sujeitas a inundações periódicas (Rey, 2002 e Neves, *et al.*, 2007).

3.1 - Sistemática

A *F. hepática* foi um dos primeiros parasitas a ser descoberto e associado à patologia que provoca, tanto em animais como no homem, por Linnaeus em 1758. Ocupa também uma posição de destaque na história da Parasitologia, pois foi também um dos primeiros parasitas cujo seu ciclo de vida foi completamente demonstrado (Lagares, 2008 e Rey, 2002).

Filo: *Plathelmyntes*

Classe: *Trematoda*

Ordem: *Echinostomatida*

Família: *Fasciolidae*

Gênero: *Fasciola*

Espécie: *Fasciola hepatica*

A Família *Fasciolidae* é relativamente pequena, sendo composta por apenas nove espécies. Estes parasitas são conhecidos por possuírem um tamanho considerável e pelo seu impacto ao nível da saúde pública e veterinária. Geralmente parasitam grandes mamíferos herbívoros, sendo que, três espécies regularmente infectam humanos, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* e *Fasciolopsis buski* (Rey, 2002 e Lofty, *et al.*, 2008). Para além destas, existem também outras espécies, tais como: *Fascioloides magna bassi*, *Fasciola jacksoni* e a *Protofasciola robusta*, que são associadas a elevadas taxas de morbidade nos hospedeiros que parasitam, podendo mesmo causarem a sua

morte (Lofty, *et al.*, 2008). Com a evolução dos estudos moleculares filogenéticos sobre este parasita, num futuro próximo a classificação da família *Fasciolidae* deverá voltar a ser revista, para que, esta seja feita com base também em estudos moleculares filogenéticos (Lofty, *et al.*, 2008). As duas principais espécies responsáveis pela Fasciolose em pequenos ruminantes e gado bovino são a *F. hepatica* e *F. gigantica* (Soliman, 2008).

3.2 – Morfologia

3.2.1 – O parasita adulto

O parasita adulto tem um comprimento que varia entre 2 a 4cm por 1 a 2 cm de largura, com as extremidades terminando em forma arredondada. O corpo é achatado dorso-ventralmente e apresenta uma cor acinzentada (Figura 7). À sua superfície possui uma camada acelular espessa denominada de tegumento, trata-se de uma membrana de organização sincicial que tem como principais funções a absorção de nutrientes, proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro, lise e digestão extracorporal de células do hospedeiro e mecanismos de fixação (Rey, 2002 e Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

Possui uma ventosa oral situada na extremidade anterior e uma ventosa ventral ou acetábulo, no terço anterior do parasita. O aparelho digestivo compreende inicialmente a boca, uma faringe musculosa e um curto segmento tubular que se bifurca em dois ramos, que percorrem todo o corpo do parasita terminando em fundo saco (Rey, 2002). O sistema excretor tem simetria bilateral e é do tipo protonefrítico, é constituído por células ciliadas, túbulos coletores, ductos excretores e uma vesícula excretora que abre para o exterior através de um nefridioporo (Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

As fasciolas são hermafroditas, podendo ocorrer fecundação cruzada. O aparelho genital feminino compreende um ovário ramificado, comunicando-se com um oótipo por meio de um curto oviduto, deste oótipo parte um tubo uterino, sinuoso e cheio de ovos em toda a sua extensão que se abre no átrio genital. O aparelho genital masculino possui dois testículos de aspeto arborescente, um canal eferente partindo de cada

testículo, une-se com o outro para formar um canal deferente, que termina na bolsa do cirro (Rey, 2002).

O sistema nervoso é na realidade um sistema neuroendócrino constituído por gânglios cerebrais situados em ambos os lados da faringe, uma série de plexos nervosos que enervam os vários órgãos, neurónios e células endócrinas que produzem e libertam vários mediadores neuronais e hormonais (Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

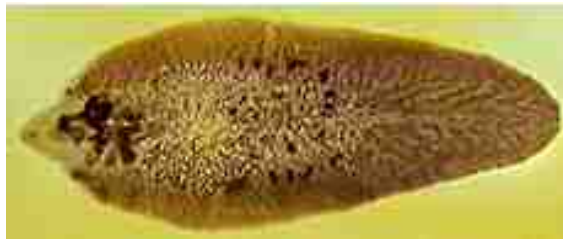


Figura 7: Exemplar de um parasita adulto de *F. hepática*
(Fonte: <http://www.parasitesinhumans.org/fasciola-hepatica-liver-fluke.html>)

3.2.2–O ovo

Tem um tamanho que varia entre 130 a 150 μm de comprimento e 60 a 100 μm de largura, forma elíptica, casca fina e possuem opérculo numa das extremidades (Figura 8). A produção de ovos por dia pode chegar aos 50 mil (Rey, 2002). O ovo apenas se desenvolve se existirem condições edafoclimáticas adequadas (temperatura, humidade e oxigénio). Estes não resistem a altas temperaturas nem a dessecação, mas podem permanecer viáveis a temperaturas de 4°C durante aproximadamente 2 anos. O pH ideal para o seu desenvolvimento é 7, mas tolera variações entre 4,2 e 9 (Costa, 2010).



Figura 8: Ovo de *F. hepática* (Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/diagnosis.html>).

3.2.3 – O miracídio

É uma larva piriforme ciliada mede aproximadamente 220-500 μ m de comprimento por 70-80 μ m de largura, possui um tempo de vida de aproximadamente 8 horas representando a forma infetante para o hospedeiro intermediário (Rey, 2002 e Costa, A. 2010).

3.2.4 – O esporocisto

O crescimento do esporocisto ocorre no hepatopâncreas do molusco, atinge uma dimensão de aproximadamente 700 μ m e corresponde a uma estrutura em forma de saco com células germinativas cujo desenvolvimento gera esporocistos de segunda geração ou às rédias (Costa, 2010).

3.2.5 – A Rédia

É alongada, tem forma cilíndrica, mede cerca de 1-3mm de comprimento e tem alguma capacidade de movimentação (Figura 9A). As suas migrações podem provocar graves lesões no hospedeiro intermediário. Já possui um esboço do tubo digestivo com boca, faringe e cego. As rédias podem dar origem a rédias de segunda e terceira geração ou a cercárias, sendo estas libertadas pelo tocóstoma ou poro obstétrico (Costa, 2010).

3.2.6 – A Cercária

Possui um corpo oval ou arredondado, mede 200 μ m e possui uma cauda simples que se agita como um chicote que mede aproximadamente 600 μ m (figura 9B). Representa o ultimo estadio larvar no interior do molusco e a sua estrutura aproxima-se bastante da forma adulta e no mesmo molusco podem existir várias fases larvares (Rey, 2002 e Costa, 2010).

3.2.7 – A Metacercária

É uma réplica juvenil do parasita adulto e representa a forma infetante para o hospedeiro definitivo. Surge como pequena formação branca, com o volume de cabeça de alfinete, semelhantes a um grão de areia. O quisto é constituído por uma parede externa com duas membranas, uma exterior de natureza proteica e uma interior fibrosa e a parede interna constituída também por duas membranas, a primeira de natureza polissacarídica e a segunda corresponde a lamelas de proteína envolvidas numa matriz de lipoproteínas. Desta forma, a metacercária consegue sobreviver no ambiente exterior sob certas condições de temperatura e humidade (Costa, 2010).

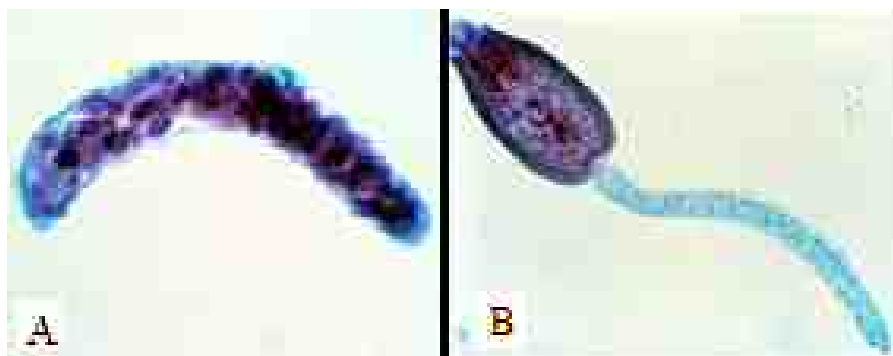


Figura 9A: Rédia de *F. hepática* (Fonte: <http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/website/lab6new2009.htm>) ;

Figura 9B: Cercária de *F. hepática* (Fonte: <http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/website/lab6new2009.htm>).

3.3– Ciclo Biológico

O parasita adulto é encontrado no fígado e nos canais biliares de maior calibre do hospedeiro vertebrado (ovinos e bovinos). Devido ao parasitismo ocorre uma hipertrofia das suas paredes e aí tem a capacidade de se alimentar tanto do conteúdo biliar como dos produtos inflamatórios do material necrótico formado. Os ovos, após ter ocorrido a fecundação, são arrastados pela biliar e misturam-se com as fezes conseguindo assim chegar ao exterior do corpo (Rey, 2002 e Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

Uma vez no exterior do corpo os ovos passam por um desenvolvimento embrionário (cerca de 10 dias), devendo para isso estar na água e em temperaturas adequadas (15 a 25°C). Após este desenvolvimento embrionário o miracídio sai a nadar

e penetra no hospedeiro intermediário (molusco pulmonado do género *Lymnaea*) (Rey, 2002 e Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). No interior do molusco, o miracídio perde os cílios e transforma-se numa estrutura alongada denominada de esporocisto, e dentro deste formar-se-á uma nova geração de larvas, as rédias. Estas por sua vez têm a capacidade de formar uma segunda geração de rédias com algumas diferenças morfológicas ou produziram diretamente cercárias (Rey, 2002 e Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

As cercárias formam-se em aproximadamente um mês e posteriormente são eliminadas do molusco. Nadam durante algum tempo e aderem com as suas ventosas à vegetação aquática e aí evoluem para metacercárias (Rey, 2002 e Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). A transmissão para os hospedeiros vertebrados ocorre quando estes ingerem água ou vegetação contaminadas com metacercárias (Soliman, 2008). O desenquistamento ocorre na luz do intestino e as larvas libertadas perfuram a parede intestinal e invadem a cavidade peritoneal para chegarem ao fígado. Uma vez no fígado demoram aproximadamente dois meses a alojarem-se nos ductos biliares durante esse período de tempo ocorre o desenvolvimento sexual (Rey, 2002 e Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

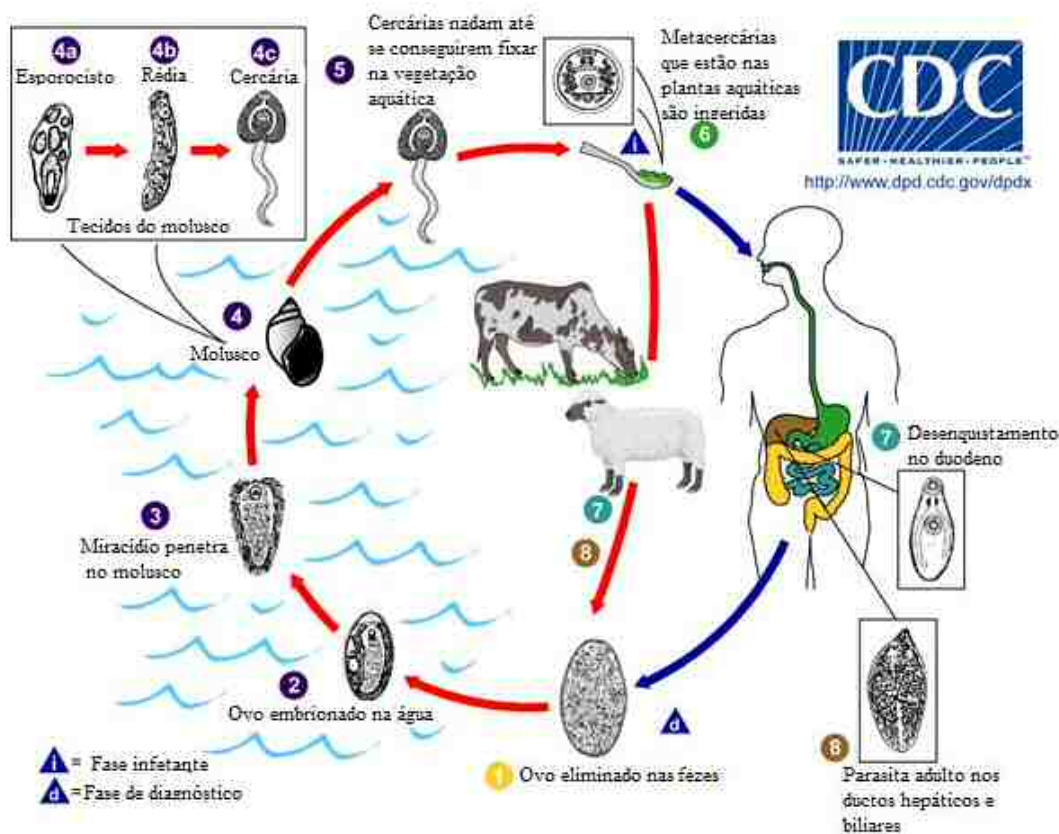


Figura 10: Ciclo biológico de *F. hepatica* (imagem adaptada de: <http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>). 1- Ovos imaturos de *F. hepatica* libertados pelas fezes para o exterior. 2- Ovos embrionam na água. 3- O miracídio eclode, nada e penetra no molusco. 4 (a, b e c) – no interior do molusco o parasita passa por diferentes estádios de desenvolvimento. 5- A cercária é libertada e fixa-se nas plantas aquáticas. 6- Metacercárias nas plantas são ingeridas de forma acidental pelos hospedeiros (mamíferos). 7- Ocorre o desenquistamento no duodeno e a migração através dos tecidos até ao fígado e ductos biliares. 8- O parasita adulto encontra-se nos ductos biliares e hepáticos.

3.4 – A Fasciolose

3.4.1 – A Fasciolose Humana

A transmissão para os humanos acontece quando estes ingerem água ou vegetais contaminados com formas infetantes (metacercárias) e aproximadamente duas semanas após a ingestão os hospedeiros apresentam na superfície do fígado numerosas lesões com 1 ou 2 mm de diâmetro, de cor creme ou rosada, correspondendo histologicamente a zonas de necrose ao longo de túneis abertos pela migração errática dos parasitas, sendo que, nas zonas mais antigas do trajeto ocorre proliferação fibrosa, com tendência para a cicatrização (Rey, 2002). A migração através do tecido ocorre com a ajuda das espinhas do tegumento do parasita e da secreção de enzimas proteolíticas (Costa, 2010). A extensão destas lesões depende do número de parasitas que penetram e com o passar do tempo os parasitas vão-se tornando maiores. Ocorre também uma hipertrofia dos canais biliares vizinhos e envolvimento dos vasos sanguíneos, seja por inflamação, trombose ou por destruição direta dos vasos e necrose parcial ou completa dos lóbulos hepáticos (Rey, 2002). Após a sétima semana, os parasitas estão no interior dos ductos biliares dilatados e com paredes hipertrofiadas, o tamanho do fígado pode aumentar ligeiramente e a parede dos ductos biliares intra e extra-hepáticos pode apresentar ulcerações ou completa destruição do epitélio, com a submucosa espessada e infiltrada de elementos inflamatórios (Rey, 2002).

A vesícula biliar pode estar normal ou ligeiramente dilatada com alterações patológicas de importância variável. Pode haver colecistite ou colelitíase, por vezes acompanhada de coledocolitíase. Fenómenos obstrutivos, fibrose, e calcificação das vias biliares são complicações também já descritas (Rey, 2002).

A fasciolose hepática, na sua forma mais grave, conduz a cirrose biliar, com compressão e atrofia do parênquima adjacente, formações edematosas e finalmente, insuficiência hepática (Rey, 2002). Migrações erráticas podem levar os parasitas aos pulmões, pâncreas, à parede do estômago ou do intestino, mas são fenómenos muito raros (Rey, 2002).

Em humanos, deve ser sempre tida em conta em zonas endémicas, sendo que, o principal grupo de risco são crianças que vivem em zonas rurais e pantanosas.

3.4.2 – A Fasciolose Animal (ovinos e bovinos)

Ovinos e bovinos devido ao fato de estarem em contacto constante com as fontes de transmissão são muito suscetíveis à infecção por *F. hepatica*, quer através da ingestão de água contaminada ou ao facto de a sua alimentação ser sobretudo à base de erva, onde estão as metacercárias que vão posteriormente provocar a infecção (Soliman, 2008). O prognóstico da parasitose depende essencialmente do número de parasitas que invadem o fígado (Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999) e está associada aos efeitos mecânicos e químicos dos parasitas e da resposta inflamatória e imunitária dos hospedeiros. Os danos provocados pela *Fasciola* são essencialmente hepáticos e incluem lesões no parênquima hepático resultantes das migrações das jovens *fascíolas* imaturas durante o período invasivo e lesões crónicas nos ductos biliares devido à presença das *fascíolas* adultas (Costa, 2010).

Alguns estudos descrevem que também já foram encontradas *fascíolas* em localizações anatómicas invulgares, como nos pulmões sob a forma de granulomas (podendo provocar pneumonia granulomatosa) e infeções intrauterinas, havendo o registo de um bezerro com 4 dias de idade a eliminar ovos (Costa, 2010). O parasita é resistente à morte intracelular por parte das células fagocíticas e à resposta inflamatória aguda persistindo no tecido afetado por muito tempo (Costa, 2010).

3.5 – Sintomatologia

3.5.1 – Em humanos

O prognóstico da patologia depende fundamentalmente do número de metacercárias ingeridas e provoca um quadro sintomático polimorfo, muitas vezes confundido com outras patologias do sistema digestivo (Rey, 2002).

Durante a fase aguda poucas vezes se suspeita desta patologia, a não ser em regiões hiperendêmicas ou em casos de surtos epidêmicos. A maioria dos pacientes é assintomática, ou apresenta sintomas inespecíficos. A principal sintomatologia compreende hepatomegalia, febre (aproximadamente 40°C), acentuada eosinofilia (60 a 80% de eosinófilos no sangue), dores abdominais e diarreia. Um quinto dos pacientes tem urticária, com dermografismo, e alguns apresentam acessos de asma. Podem também apresentar alterações nas provas da função hepática e anemia (Rey, 2002).

Na fase crónica os sintomas mais frequentes são: dor abdominal, geralmente localizada no epigástrio ou no hipocôndrio direito, com carácter de dor cólica, ou de outro tipo, com poucas evacuações diárias ou, em alguns casos, obstipação intestinal, anorexia e dispepsia. Muitas vezes existe perda de peso, um quadro de icterícia, esplenomegalia, prurido e urticária. Os eosinófilos geralmente também estão elevados (25-80%), anemia leve ou moderada (Rey, 2002). Agravamentos súbitos da evolução clínica costumam resultar de uma infeção biliar, ou de uma obstrução mecânica, por parasitas ou por cálculos, exigindo intervenção cirúrgica de urgência. Os casos fatais conhecidos estavam relacionados com elevada carga parasitária, na fase aguda, ou com acidentes hemorrágicos (Rey, 2002).

3.5.2 – Em animais ovinos e bovinos

Em animais os sinais mais característicos estão relacionados com o número de metacercárias ingeridas, e incluem perda de peso, anorexia, mucosas pálidas ou ictericas, constipação intestinal intensa durante a qual as fezes eliminadas são duras e quebradiças e podem também apresentar-se pouco ativos e letárgicos (Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999 e Mitchell, 2002).

A forma crónica, no entanto, evolui com perda de condição corporal progressiva, inapetência, pelo eriçado, seco, baço e quebradiço (Costa, 2010), diminuição ou supressão da produção de leite, atraso no crescimento, diarreia que alterna com obstipação, edemas submandibulares (Pritchard, *et al.*, 2005) e abdominais, embora outros autores refiram que o edema submandibular e a ascite não são comuns e não há relatos de dor à palpação, nem hepatomegalia (Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). A parasitose pode originar morte súbita devido à grande perda de sangue e à falha da função hepática, sem sintomatologia e nos casos de parasitismo intenso (Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

3.6 – Diagnóstico

3.6-1 – Diagnóstico clínico em humanos

Como referido anteriormente a fasciolose provoca um quadro sintomático polimorfo e muitas vezes é confundida com outras doenças do sistema digestivo. O quadro mais sugestivo, para o diagnóstico clínico da infeção, é a eosinofilia (mais de 5000 eosinófilos/mm³) e febre, normalmente acompanhada de hepatomegalia e dor no hipocôndrio direito. Durante a ocorrência de pequenos surtos epidémicos, é eventualmente possível relacionar as manifestações patológicas com alguma refeição coletiva, em que se consumiu por exemplo agriões contaminados (Rey, 2002).

3.6.2 – Diagnóstico laboratorial tradicional e molecular

Um diagnóstico seguro deve basear-se na pesquisa de ovos do parasita nas fezes ou no suco duodenal (obtido por sondas) (WHO, 2006 e Espinoza, *et al.*, 2010). É recomendado que sejam recolhidas 3 amostras de fezes de forma seriada (3 dias intercalados) e utilizar técnicas de concentração, por sedimentação ou centrifugação, repetindo os exames várias vezes, sendo que a técnica Kato-Katz apresenta maior sensibilidade do que o exame coprológico direto (Espinoza, *et al.*, 2010). Existe também a possibilidade de a pesquisa de ovos permanecer reiteradamente negativa,

facto que se deve à escassez ou ausência de oviposição nas infeções humanas (Rey, 2002).

Uma possível fonte de erro no diagnóstico parasitológico está relacionada com a ingestão de fígado de animais infetados, pois os ovos aí contidos vão atravessar todo o tubo digestivo e aparecer nas fezes, gerando falsos positivos. Por isso é recomendado que o paciente se abstenha desse tipo de alimentos durante alguns dias antes do exame (Rey, 2002).

Para contornar estas dificuldades, existem métodos de imunodiagnóstico, como a técnica de ELISA, a imunofluorescência indireta, a aglutinação e Western Blot (Espinoza, *et al.*, 2010). Sabe-se que a *F. hepatica* tem elevada imunogenicidade e são produzidos anticorpos específicos contra os antigénios do parasita, o que permite que os testes imunológicos sejam positivos na fase aguda, duas semanas depois da infeção (Rey, 2002).

A técnica de ELISA é a técnica imunológica de eleição para a deteção da Fasciolose humana, nomeadamente a FAS2-ELISA. Esta técnica tem a capacidade de detetar anticorpos IgG produzidos contra o antigénio FAS2 do parasita adulto durante a fase aguda, crónica e ectópica. Em estudos realizados obteve-se uma sensibilidade de 96,7% contra 72% da técnica de Western-Blot. A técnica de Western-Blot é utilizada para detetar proteínas excretadas/secretadas pelo parasita adulto onde são utilizados antigénios contra essas mesmas proteínas, permitindo assim detetar a presença ou não das mesmas e a respetiva quantidade, sendo que a técnica FAS2-ELISA não apresenta reações cruzadas com outras infeções parasitárias. Mas o grande problema destas técnicas imunológicas é o facto de não distinguirem entre infeção passada ou atual, portanto, um resultado positivo com um quadro clínico compatível com fasciolose pode resultar de uma resposta imunológica a uma infeção passada (Espinoza, *et al.*, 2010).

A tomografia axial computadorizada, ecografia e a ressonância magnética podem constituir métodos auxiliares para a localização das lesões e de parasitas móveis nas vias biliares, bem como permitir o acompanhamento após tratamento (Rey, 2002 e Espinoza, *et al.*, 2010).

Durante muito tempo a identificação de *Fasciola* spp. foi baseada sobretudo na identificação morfológica (quer dos ovos, quer do parasita adulto), mas isto apresentava

muitas limitações e com o surgimento de técnicas moleculares algumas foram desenvolvidas e aplicadas para a identificação e diferenciação de *Fasciola* spp. As técnicas mais utilizadas são: PCR, multiplex PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR ou real-time PCR. O alvo destes estudos são fundamentalmente as regiões ITS1 e ITS2 (Ai, *et al.*, 2011) (ver descrição das técnicas moleculares na seção 5 da introdução, na página 50).

3.6.3 – Diagnóstico em ovinos e bovinos

O diagnóstico em animais deve basear-se na sintomatologia, na ocorrência sazonal, nos tipos de clima prevalentes e na história prévia de fasciolose na exploração ou na identificação de habitats de caracóis (Urquhart, *et al.*, 1996). Durante a pesquisa de sinais clínicos na exploração, apesar de serem bastante aleatórios, devem ser suficientemente expressivos para que o veterinário possa diagnosticar a patologia, inicialmente deve ser pesquisada a forma crónica da patologia nos animais (sintomas descritos anteriormente), e caso se justifique a realização de exames de diagnóstico (Costa, 2010).

O diagnóstico *ante-mortem* mais utilizado para se proceder ao diagnóstico desta parasitose em animais é a pesquisa de ovos nas fezes, no entanto, em bovinos os ovos são eliminados de forma irregular e em pequeno número. Assim o número de ovos nas fezes não é diretamente proporcional à carga parasitária. A deteção de um só ovo num único animal numa exploração ou num grupo deve ser considerado como uma prova de infeção do rebanho e deve conduzir ao tratamento de toda a exploração ou grupo de origem o mais rapidamente possível (Costa, 2010).

O diagnóstico pode também ser feito recorrendo a testes de imunodiagnóstico, tais como: ELISA, hemaglutinação e imunofluorescência indireta, sendo os testes ELISA os mais utilizados devido ao facto de serem sensíveis, baratos e de fácil procedimento, sendo o fundamento da técnica semelhante ao que é utilizado para diagnosticar a infeção humana (Dorchies, 2006).

No entanto, o exame *post-mortem* no matadouro representa o melhor meio para identificar *F. hepatica*. As lesões de fasciolose no fígado são a prova da presença do

parasita na exploração. Uma das limitações destes achados *post-mortem* é o facto de em infeções moderadas ou precoces muitas vezes estas lesões não serem perfeitamente visíveis. Os achados de necropsia dependem da idade do animal, da carga parasitária, da duração da infeção, do estado nutricional e imunológico prévios do animal e do grau de compensação (Costa, 2010).

As técnicas moleculares referidas para o diagnóstico em humanos, também podem ser aplicadas a animais, nomeadamente no estudo dos ovos excretados nas fezes e em eventuais parasitas adultos detetados no exame *post-mortem* (Shahzeem, *et al.*, 2012).

3.7 – Epidemiologia

3.7.1 – O parasita no mundo

A presença de *F. hepatica* depende dos fatores que contribuem para a existência dos moluscos (hospedeiros intermediários), ou seja, a existência de habitats adequados e condições ambientais favoráveis, fundamentalmente a humidade (para a reprodução dos caracóis) e a temperatura para o desenvolvimento dos miracídios e das restantes formas (Rangel-Ruiz, *et al.*, 1999 e Pritchard, *et al.*, 2005).

A fasciolose humana tem sido descrita um pouco por todo o mundo, desde a Europa, Américas, Oceânia, Africa e Asia, sendo que, nos últimos anos o número de casos tem aumentado (Soliman, 2008 e Ahmadi, *et al.*, 2010). Calcula-se que a nível mundial existam cerca de 2.4 milhões de pessoas infetadas e 180 milhões estão em risco de contrair a infeção (WHO, 2006) e estima-se que a prevalência seja superior em zonas onde, para além de todas as condições climáticas favoráveis, existe também uma intensa produção de gado ovino e bovino e onde a dieta inclui o consumo de vegetais aquáticos crus (Soliman, 2008).

Nas zonas temperadas da Europa, as baixas temperaturas representam um fator limitante na progressão do ciclo de vida, ocorrendo assim a transmissão principalmente entre Maio e Outubro (Costa, 2010). A densidade máxima de metacercárias na erva surge no fim do Verão e Outono, as manifestações clínicas aparecem, normalmente, no fim do Outono e durante o Inverno (Cordero-del-Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

Estudos de prevalência mostram a influência significativa do tipo de manejo nas infecções por *F. hepatica* em bovinos e ovinos. É verificada uma maior prevalência em explorações tradicionais de grande escala em comparação com as produções em pequena escala, o que pode ser atribuído ao elevado potencial biológico do hospedeiro intermediário e medidas insuficientes de tratamento e controlo (Yildirim, *et al.*, 2007).

Em termos de prevalência, estudos anteriores, em ovinos foram detetadas taxas de prevalência de: 5,45% na Turquia (Kara, *et al.*, 2007) a 12% (Ghazani, *et al.*, 2008). Em bovinos foram detetadas taxas de prevalência de 2,63% no Iraque (Kadir, *et al.*, 2008) a 10,34% no Brasil (Marques, *et al.*, 2003).

3.7.2 – O parasita em Portugal

Em Portugal nunca foi realizado um estudo que englobasse todo o país, tendo sido alvo de estudo apenas algumas regiões. Do ponto de vista económico sabe-se que esta parasitose provoca enormes perdas, devido ao seu impacto no bem-estar e saúde animal, podendo afetar a viabilidade económica das explorações agrícolas afetadas.

Um estudo realizado no Norte de Portugal e Noroeste de Espanha, mais precisamente no matadouro de Lugo (Espanha), onde semanalmente são abatidos cerca de 1300 animais (gado bovino) oriundos destas duas regiões, revelou uma prevalência de *F. hepatica* de aproximadamente 28% (Arias, *et al.*, 2011).

Um outro estudo realizado no concelho de Odemira, em bovinos provenientes de 4 explorações de regime extensivo, foi detetada uma prevalência de 3,7% através de técnicas serológicas, tendo a pesquisa de ovos de *Fasciola* nas fezes sido negativa para todos os animais (Cardozo, 2010).

4 – *Dicrocoelium dendriticum*

O *D. dendriticum* é o agente etiológico da Dicroceliose humana/animal, uma patologia que pode afetar um número muito grande de mamíferos, fundamentalmente pequenos ruminantes e bovinos, sendo frequentemente encontrado no fígado e canais biliares juntamente com *F. hepatica*, pelo que durante muito tempo foi considerado uma forma imatura desta (Ekstam, 2011).

4.1 – Sistemática

Descoberto por Rudolphi, em 1819, foi inicialmente considerado uma forma imatura de *F. hepatica* e só posteriormente foi classificado como uma espécie independente (Otranto, *et al.*, 2007).

Filo: *Plathelmyntes*

Classe: *Trematoda*

Ordem: *Plagiorchiida*

Família: *Dicrocoeliidae*

Género: *Dicrocoelium*

Espécie: *Dicrocoelium dendriticum*

Representa a espécie mais comum do género *Dicrocoelium* e a que foi descrita em mais regiões do mundo, desde Portugal até à Ásia, passando pela América do Norte (Gonzalez-Lanza, *et al.*, 1993; Cameron, *et al.*, 2007 e Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001).

A espécie *D. hospes*, identificada em 1907, por Looss, é bastante frequente, mas apenas no continente africano e tem também a capacidade de afetar o fígado e canais biliares de pequenos ruminantes, tanto domésticos como selvagens (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001 e Otranto, *et al.*, 2007).

Outra espécie identificada foi *D. orientalis*, em 1951 por Sudarikove Ryjikov, que foi posteriormente renomeada para *D. chinensis*, em 1978, devido a partilharem as mesmas características morfológicas. Atualmente ainda existe muito pouca informação sobre esta espécie, tendo já sido encontrada de forma esporádica em Itália e Áustria,

mas está essencialmente associada ao continente asiático, mais precisamente à China (Otranto, *et al.*, 2007).

As espécies do género *Dicrocoelium* apresentam diferenças a nível morfológico, genético, epidemiológico, ecológico, imunológico, patogénico e sensibilidade a fármacos (Campo, *et al.*, 1998 e Otranto, *et al.*, 2007).

4.2 – Morfologia

4.2.1 – O parasita adulto

Tem o corpo em forma de lanceta, não segmentado, em forma de folha, apresenta um tamanho que varia entre os 5 a 10 mm de comprimento e 2 a 3 mm de largura, epiderme revestida por cutícula e apresenta duas ventosas (para fixação do parasita ao hospedeiro), uma oral e outra ventral (Figura 11). O aparelho digestivo situa-se na zona posterior do corpo e termina em forma de saco (Schweiger, *et al.*, 2008).

É hermafrodita, com fecundação interna, e na sua região anterior possui dois testículos lobulados justapostos ao ovário, o útero encontra-se mais abaixo na sua seção média. As glândulas vitelinas flanqueiam os órgãos reprodutores e são muito importantes na produção de ovos (Otranto, *et al.*, 2007).



Figura 11:Exemplar de um parasita adulto de *D. dendriticum* (fonte: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Dicrocoeliasis_il.htm)

4.2.2 – O ovo

São ovais e apresentam um tamanho de aproximadamente 35 a 50 μ m de comprimento e 20 a 30 μ m de largura, com cor acastanhada, são operculados e no seu interior contêm um miracídio (Figura 12). Têm grande capacidade de resistência no meio ambiente às variações de temperatura e podem permanecer viáveis durante um período de 20 meses nas pastagens (Schweiger, *et al.*, 2008).



Figura 12: Ovo de *D. dendriticum* (Fonte: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Dicrocoeliasis_il.htm).

4.3 – Ciclo biológico

O ciclo de vida deste trematode é extremamente complexo (Figura 13), necessitando de dois hospedeiros intermediários, sendo que, o parasita adulto habita no fígado e nas vias biliares dos hospedeiros definitivos, principalmente ruminantes, equídeos e coelhos. Mas também pode ser encontrado de forma ocasional em canídeos, roedores, suínos, primatas, e acidentalmente o Homem, sendo estes classificados de hospedeiros ocasionais (Ekstam, 2011). É nestes hospedeiros definitivos que o parasita deposita os seus ovos embrionados, estes por sua vez passam através do intestino para serem eliminados com as fezes para o meio ambiente (Otranto, *et al.*, 2007 e Schweiger, *et al.*, 2008).

Uma vez no meio ambiente, para continuar o seu ciclo biológico, os ovos têm que ser ingeridos por moluscos gastrópodes terrestres, principalmente dos géneros *Cionella*, *Zebrina*, *Cerņuellae* e *Helicella*, representando estes o primeiro hospedeiro intermediário. É no intestino destes que ocorre a eclosão e libertação dos miracídios, que penetram a parede intestinal e migram até ao hepatopâncreas do molusco, onde se

deposita e se transforma em esporocisto “mãe” (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001; Schweiger, *et al.*, 2008 e Ekstam, 2011).

São produzidos esporocistos “filhos” que possuem a sua própria parede e no seu interior são produzidas cercárias, através de reprodução assexuada. Quando as cercárias completam o processo de formação migram para a câmara respiratória do molusco onde são posteriormente eliminados, em bolas de muco, pelo pneumóstoma através dos movimentos respiratórios (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001 e Schweiger, *et al.*, 2008).

Quando as bolas de muco são ingeridas por formigas do género *Formica* (segundo hospedeiro intermediário) as cercárias atravessam o papo das formigas, perdem a cauda e migram para o abdómen onde se transformam em metacercárias, tendo uma cercária tem a capacidade de migrar para o gânglio sub-esofagal (região do cérebro) da formiga, onde se instala (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001 e Schweiger, *et al.*, 2008).

Quando ocorre uma diminuição da temperatura (geralmente do final do dia até à manhã seguinte) a cercária alojada no gânglio sub-esofagal altera o comportamento da formiga, provocando uma limitação ao nível dos músculos mandibulares, levando a que esta fique temporariamente ligada à erva, o que aumenta a probabilidade da formiga ser ingerida pelos hospedeiros definitivos, sinais estes que desaparecem após o aumento da temperatura no dia seguinte e a formiga volta à normalidade (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001; Schweiger, *et al.*, 2008 e Ekstam, 2011).

Após a ingestão de formigas pelos hospedeiros definitivos (ovinos e bovinos), ocorre no intestino o desenquistamento das metacercárias (que estavam no abdómen da formiga), e o parasita migra até ao fígado e canais biliares onde se desenvolvem até à fase adulta (Schweiger, *et al.*, 2008 e Ekstam, 2011).

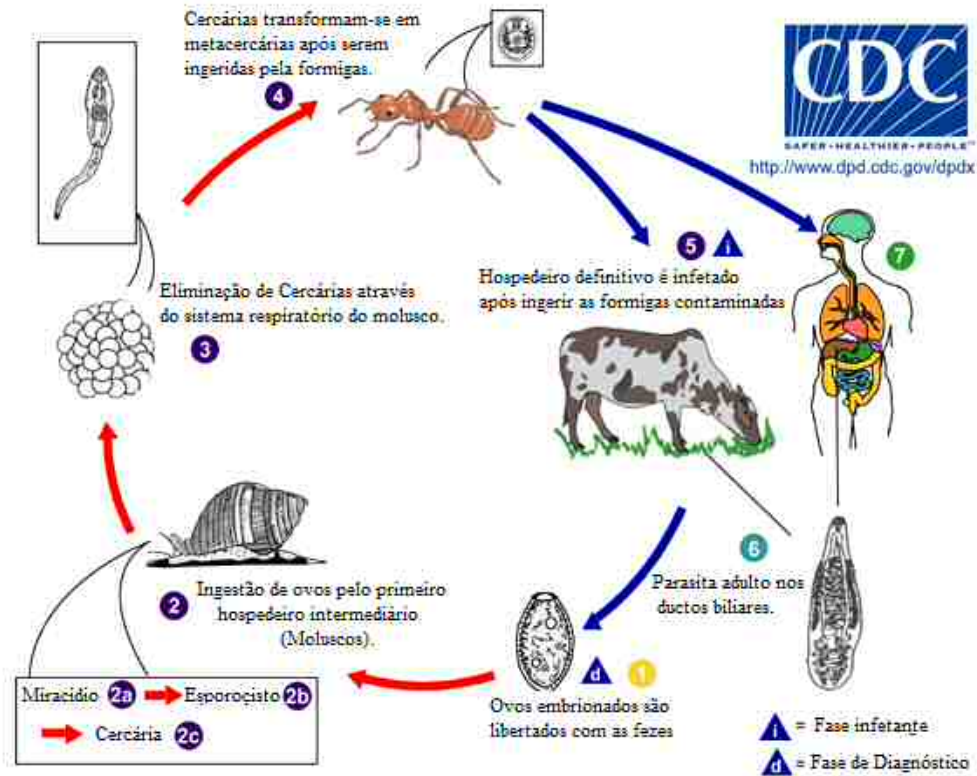


Figura 13: Ciclo biológico de *D. dendriticum* (Fonte: imagem adaptada de http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Dicrocoeliasis_il.htm). 1- Ovos embrionados são libertados com as fezes do hospedeiro definitivo. 2- Ingestão de ovos pelo primeiro hospedeiro intermediário, e desenvolvimento do miracídio até à cercária. 3- Eliminação de cercárias através de bolas de muco expelidas pelo sistema respiratório do molusco. 4- Após a ingestão das cercárias pelas formigas ocorre a transformação em metacercária. 5- O hospedeiro definitivo é infetado após ingerir as formigas contaminadas com metacercárias.

4.4 – A Dicroceliose

4.4.1 – A Dicroceliose Humana

A infecção humana está relacionada com a ingestão acidental de formigas que contêm no interior do seu abdômen metacercárias, no intestino ocorre o seu desenquistamento e as larvas atravessam a parede do intestino migrando posteriormente até ao fígado e canais biliares onde se alojam e desenvolvem até à fase adulta (Jeandron, *et al.*, 2011).

A maioria dos casos são assintomáticos, devido às suas manifestações serem maioritariamente subclínicas, as lesões hepáticas que este parasita provoca no Homem passam muitas vezes despercebidas, e apenas se manifestam em caso de coinfeções com outros helmintas ou se ocorrer uma baixa de imunidade no hospedeiro, como por exemplo em portadores de HIV (Jeandron, *et al.*, 2011).

4.4.2 – A Dicroceliose Animal (ovinos e bovinos)

Em ovinos e bovinos a transmissão é feita através da alimentação, nomeadamente após a ingestão de formigas (que têm no seu abdômen metacercárias) que estão presentes nas pastagens, sendo que quanto maior for a carga parasitária ingerida (número de metacercárias ingeridas) maior será a probabilidade de a patologia se desenvolver e apresentar sintomas de maior gravidade (Cameron, *et al.*, 2007).

Tal como em humanos o desenquistamento ocorre no intestino e as larvas atravessam a parede intestinal e migram para o fígado e canais biliares onde se alojam e desenvolvem até à fase adulta. É durante esse desenvolvimento que os primeiros problemas começam a surgir, começam a ocorrer alterações na superfície dos ductos biliares e lesões fibróticas do fígado a isto podem também estar associadas infeções bacterianas oportunistas. Todos estes problemas podem resultar numa diminuição da produção de leite, de carne e de lã (Ahmedi, *et al.*, 2011).

4.5 – Sintomatologia

4.5.1 – A Sintomatologia em Humanos

Como referido anteriormente a maioria dos casos são assintomáticos, devido às suas manifestações serem maioritariamente subclínicas, e a maioria dos problemas provocados por este parasita são camuflados por coinfeções provocadas por outros helmintas também presentes, como por exemplo a *F. hepatica* (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001).

Porém existem casos descritos onde foram detetados problemas gastrointestinais (diarreia crónica, perda de peso, dor abdominal), obstruções biliares, alterações hepáticas (devido ao espessamento dos ductos hepáticos principais, proliferação glandular, aumento do tecido conjuntivo, infiltração celular e proliferação dos ductos biliares de menor calibre), irritação crónica do fígado e das superfícies dos ductos biliares (devido à ventosa de fixação o parasita), hepatomegalia, hipereosinofilia e urticária (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001 e Magi, *et al.*, 2009).

4.5.2 – A Sintomatologia em ovinos e bovinos

Em animais a sintomatologia varia consoante a carga parasitaria ingerida, se for uma infeção massiva um grande número de parasitas podem ser encontrados nos ductos biliares e vesícula biliar, levando a um espessamento dos ductos biliares e a hepatomegalia, poderá ocorrer um quadro de insuficiência hepática e em último caso poderá ocorrer cirrose hepática. A inflamação crónica pode levar também a alterações das transaminases (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001 e Ahmedi, *et al.*, 2011).

4.6 – O Diagnóstico

4.6.1 – O Diagnóstico clínico em humanos

Esta patologia não tem grande impacto na saúde humana e devido as suas manifestações serem maioritariamente subclínicas muitas vezes não é diagnosticada. Recomenda-se que os clínicos situados em regiões endémicas estejam informados sobre esta parasitose, para que à mínima suspeita os testes laboratoriais possam ser executados. Em casos mais graves, com uma maior carga parasitária podem surgir cólicas biliares, distúrbios digestivos gerais, incluindo distensão abdominal e diarreia (Cengiz, *et al.*, 2010).

4.6.2 – O Diagnóstico laboratorial tradicional e molecular

A técnica considerada como “gold standard” para o diagnóstico da Dicroceliose é a deteção de ovos nas fezes. Após um período de 3 dias sem ingerir fígado, ou produtos derivados de fígado são recolhidas 3 amostras de fezes de forma seriada e em 3 dias diferentes, o processamento das amostras é efetuado com técnicas de concentração/sedimentação e posteriormente é pesquisada a presença de ovos de *D. dendriticum* (Cengiz, *et al.*, 2010).

A presença de ovos acompanhada de um aumento do número de eosinófilos, e ligeiro aumento dos valores da fosfatase alcalina, transaminases (Cengiz, *et al.*, 2010) e bilirrubina (que regressa aos valores normais após tratamento), revelam uma infeção ativa (Magi, *et al.*, 2009).

Podem também ocorrer casos de pseudo-infeções, nomeadamente quando se deteta a presença de ovos nas fezes, mas não o agente patológico não está presente, isto deve-se sobretudo ao consumo de fígado contaminado com ovos de *D. dendriticum*, por isso se pede ao paciente que se abstenha de comer fígado, ou produtos derivados (Jeandron, *et al.*, 2011).

A nível molecular ainda pouco foi estudado sobre este parasita, mas as abordagens que têm sido feitas passam essencialmente por PCR e pela sequenciação de genes ou partes destes (ver descrição das técnicas moleculares na secção 5 da introdução, na página 50).

4.6.3 – O Diagnóstico em animais (ovinos e bovinos)

O diagnóstico da Dicroceliose animal e sobretudo feito no exame *post-mortem* dos animais, em que é examinado o fígado e canais biliares e o parasita é detetado no seu interior, sendo também visíveis pequenas manchas brancas ou cicatrizes na superfície do fígado, devido à entrada das larvas (Ahmedi, *et al.*, 2011).

O diagnóstico em animais vivos passa essencialmente pelo exame coprológico para detetar a presença de ovos nas fezes dos animais. As amostras são colhidas diretamente do reto dos animais e após técnicas de concentração/sedimentação é pesquisada a presença de ovos de *D. dendriticum*. Um resultado negativo, ou seja, a não presença de ovos, não é sinónimo de ausência da infeção, poder estar num período em que os ovos não são eliminados (Gonzalez-Lanza, *et al.*, 1993).

4.7 – Epidemiologia

4.7.1 – O parasita no mundo

Os parasitas do género *Dicrocoelium* encontram-se espalhados um pouco por todo o mundo, e para isso contribuem fatores ambientais e fatores relacionados com os hospedeiros intermediários e definitivos, sendo que, a espécie mais conhecida e encontrada é o *D. dendriticum*. Existem registos que indicam a sua presença desde Portugal até à Ásia e América do Norte (Gonzalez-Lanza, *et al.*, 1993; Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001; Cameron, *et al.*, 2007; Jeandron, *et al.*, 2011 e Ahmedi, *et al.*, 2011). A espécie *D. hospes* encontra-se associada a África e a *D. chinensis* ao continente asiático (China, Japão e este da Sibéria) (Otranto, *et al.*, 2007).

Como referido anteriormente a distribuição mundial de *D. dendriticum* depende de vários fatores, nomeadamente fatores ambientais e fatores relacionados com os hospedeiros intermediários e definitivos. A nível ambiental a dispersão dos ovos pelas pastagens é assegurada pelos hospedeiros definitivos, onde devido à sua extrema resistência têm a capacidade de permanecer viáveis até 20 meses (Schweiger, *et al.*, 2008). Em relação aos hospedeiros intermediários, mais de 100 espécies de moluscos podem atuar como primeiros hospedeiros intermediários (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001)

o que a juntar ao facto de no seu interior ocorrer reprodução assexuada de cercárias aumenta assim a probabilidade de transmissão. Sabe-se também que moluscos de maiores dimensões são mais suscetíveis a serem infetados e que a transmissão ocorre ao longo de todo o ano, sendo registado um pico de transmissão nos meses da primavera (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001).

A importância das formigas na epidemiologia da Dicroceliose está relacionada principalmente com a sua abundância e com o facto de as alterações provocadas pelo parasita no cérebro, aumentarem a probabilidade destas serem ingeridas pelos hospedeiros definitivos. Estando atualmente descritas cerca de 21 espécies de formigas como possíveis hospedeiros intermediários secundários (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001).

O principal problema a nível epidemiológico dos hospedeiros definitivos é o facto de o parasita se adaptar a uma ampla gama de animais. Estudos sobre a epidemiologia do *D. dendriticum* referem que os principais hospedeiros definitivos são herbívoros, mas também é frequentemente encontrado em carnívoros e omnívoros e de forma accidental em humanos (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001).

Fatores culturais também podem estar relacionados com a epidemiologia da Dicroceliose, nomeadamente, a transumância. Uma vez que a circulação de animais pelas pastagens de montanha (onde estes podem contrair a infeção) e posteriormente a sua deslocação para o vale durante o inverno, poderá levar a que comecem a surgir casos de animais infetados no vale (Manga-Gonzalez, *et al.*, 2001).

Um estudo *post-mortem* realizado na Suíça, em fígados de bovinos revelou uma prevalência de 62,5% em bovinos do sexo feminino e 9,8% em bovinos do sexo masculino. A diferença nestes valores poderá dever-se ao facto de os bovinos do sexo feminino pastarem durante largas temporadas tendo assim uma maior probabilidade de adquirirem a infeção e os bovinos do sexo masculino estarem a maior parte do tempo em unidade de engorda (Ducommun, *et al.*, 1991); um outro estudo no Irão detetou prevalências de 85 e 66% em ovinos e bovinos, respetivamente (Ahmedi, *et al.*, 2011)

4.7.2 – O parasita em Portugal

Em Portugal este parasita tem sido muito pouco estudado, e pouco se sabe sobre o seu verdadeiro impacto nas populações ovinas e bovinas. Segundo Cordero (1980) a Dicroceliose era uma parasitose muito disseminada na península ibérica, mas poucos dados existem para comprovar esta afirmação, sabe-se que num estudo realizado na província de León (Espanha) foi detetada uma prevalência de 37, 64% em amostras de gado bovino (Gonzalez-Lanza, *et al.*, 1993).

5 – Técnicas moleculares aplicadas no diagnóstico e estudo da diversidade genética dos parasitas

5.1 – Polymerase chain reaction (PCR)

É um método que permite a amplificação e detecção de DNA dos parasitas, utiliza duas sequências iniciadores “Primers” direcionados para regiões alvo do genoma dos parasitas, originando fragmentos que podem, posteriormente, ser visualizados através de eletroforese em gel de agarose. Contribuiu para os mais recentes avanços científicos e é utilizada no estudo de todos os organismos que possuam DNA, sendo que, é também a base de muitas outras técnicas moleculares.

Esta técnica tem sido utilizada no estudo da variação genética dos 3 parasitas estudados, as regiões mais estudadas no genoma do *E. granulosus* têm sido os genes mitocondriais *cox1* (cytochrome C oxidase subunit 1 (CO1)) e *nad1* (NADH dehydrogenase I (ND1)), que permitem identificação de estirpes (Naidich *et al.*, 2006). Na *F. hepatica* as regiões mais estudadas têm sido a ITS1, ITS2, *nad1* e *cox1*, e permitem a detecção de *F. hepatica* e a diferenciação de *Fasciola spp.* (Ai, *et al.*, 2011). *D. dendriticum* pouco tem sido estudado a nível molecular, as regiões alvo do seu genoma mais estudadas têm sido a 28S e ITS2, permitindo a diferenciação de isolados do género *Dicrocoelium* (Maurelli, *et al.*, 2007 e Otranto, *et al.*, 2007).

5.2 – Restriction fragment length polymorphism PCR (RFLP-PCR):

É uma variação da técnica de PCR que explora variações em sequências de DNA, inicialmente a sequência alvo é amplificada por PCR e posteriormente os fragmentos são digeridos por enzimas de restrição. Os principais alvos desta técnica são regiões do RNA ribossomal (rRNA), cujos genes apresentam regiões codificantes altamente conservadas e separadas por regiões não codificantes pouco conservadas (Gasser & Chilton, 1995 e McManus, 2002). Este método é muito sensível, pois teoricamente, deveria ser possível diferenciar os parasitas a partir de pequenas quantidades de DNA.

A principal região estudada no genoma do *E. granulosus* tem sido a “internal transcribed spacer 1” (ITS1) e permite distinguir as diversas espécies (Cuesta-Bandera

et al., 1988; Bowles & McManus, 1993b; Hope *et al.*, 1991 e Eckert *et al.*, 2001 e McManus, 2002). No género *Fasciola* permite a diferenciação entre *F. hepatica* e *F. gigantica*, e os principais alvos estudados são as regiões ITS1 e ITS2 (Ai, *et al.*, 2011 e Dar *et al.*, 2012).

5.3 – Random amplification of polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR):

Este método baseia-se na deteção de polimorfismos em DNA genómico encontrados através da sua amplificação usando um único “primer” de sequência nucleotídica arbitrária. Este método amplifica qualquer DNA presente na amostra, pelo que é essencial que o DNA utilizado não esteja contaminado e garantir a esterilidade de todos os materiais e reagentes, e é necessário o uso de vários controlos negativos. Os perfis obtidos por RAPD são muitas vezes complexos e de difícil análise, e de reprodutibilidade baixa. Por isso, e para que os resultados obtidos sejam credíveis é necessário que todos os processos sejam cuidadosamente controlados, especialmente a qualidade e quantidade de DNA e do “primer” assim como o uso de réplicas e controlos positivos.

Técnica utilizada para distinguir geneticamente algumas das estirpes de *E. granulosus* e também para avaliar a sua relação filogenética (Thompson, *et al.*, 1998, Eckert *et al.*, 2001; McManus, 2002, McManus & Thompson, 2003 e Taha, 2012). Em *F. hepatica* tem sido utilizada para detetar infeções em hospedeiros intermediários e definitivos, bem como a diferenciação genética de espécies do género *Fasciola* através da análise das regiões *cox1*, ITS1 e ITS2 e de fragmentos de regiões repetitivas não codificantes (Ai, *et al.*, 2011).

5.4 – Multiplex PCR:

É uma modificação da técnica de PCR em que em vez de um par de “primers” são utilizados dois ou mais pares de “primers” na mesma mistura de PCR. São amplificados fragmentos de diferentes tamanhos que são associados a sequências diferentes possibilitando, por exemplo, detetar diferentes espécies do género *Fasciola* (Ai, *et al.*, 2011).

As principais regiões estudadas através desta técnica foram a região ITS1, ITS2 e *cox1*, e tem sido muito utilizada para diferenciar as diferentes espécies do género *Fasciola* (Ai, *et al.*, 2011).

5.5 – Real time PCR

É outra variante da técnica de PCR, e tem a capacidade de simultaneamente amplificar, detetar e quantificar os fragmentos produzidos em tempo real. Tem sido utilizada na identificação das diferentes espécies do género *Fasciola* e a principal região alvo estudada é a ITS2 (Ai, *et al.*, 2011).

5.6 – Sequenciação de DNA:

É uma técnica que tem sido cada vez mais utilizada, devido aos custos terem baixado significativamente e ter aumentado o conhecimento sobre o genoma dos diferentes parasitas. Inicialmente é feita a amplificação de determinadas sequências do genoma do parasita através de PCR, posteriormente é executada a sequenciação em si, por exemplo, através do método de Sanger. É então conhecida a ordem dos nucleótidos da sequência em questão. Com o auxílio de programas informáticos, como por exemplo o “Bioedit” (Ibis Biosciences), é possível associar a sequência a outras existentes em bases de dados e assim identificar a sequência estudada.

Possibilita a identificação de espécies do género *Echinococcus* e respetivos genótipos, as regiões mais sequenciadas têm sido os genes CO1 e ND1, que estão na origem da sua classificação (Bowles & McManus, 1993b e Eckert *et al.*, 2001). O

genoma de *E. multilocularis* já foi também sequenciado, para uso como referência. *F. hepatica* também tem sido muito estudada e sequenciada, permitindo identificar espécies e híbridos do género *Fasciola*, sendo os principais alvos são as regiões ITS1, ITS2, *nad1*, *cox 1* e 28S (Ai, *et al.*, 2011 e Dar *et al.*, 2012). De todos os parasitas estudados, *D. dendriticum* é o que tem sido menos sequenciado, as principais regiões têm sido os genes 18S, 28S e ITS2 e permite a diferenciação molecular e estudo da variação inter e intraespecífica de *D. dendriticum*, *D. hospes* e *D. chinensis* (Maurelli, *et al.*, 2007 e Otranto, *et al.*, 2007).

Capítulo II – Objetivos

Capítulo II- Objetivos

O *E. granulosus*, *F. hepatica* e *D. dendriticum* são 3 helmintas que estão associados a parasitoses que provocam problemas de saúde pública e económicos em explorações pecuárias. Dado o impacto que estas parasitoses têm torna-se necessário desenvolver metodologias e técnicas que permitam detetar a presença destes parasitas, quer em animais quer em humanos, e assim proceder ao rápido diagnóstico de eventuais parasitoses. A prevalência destas parasitoses é provavelmente sub-estimada por estar dependente de estudos epidemiológicos em explorações ou de registos pelos veterinários aquando do abate de animais.

O principal objetivo deste estudo é estimar a prevalência destas helmintoses e a sua distribuição, em animais abatidos em matadouros de Portugal, particularmente em ovinos e bovinos, e perceber se as metodologias atualmente utilizadas são eficazes na deteção dos parasitas, principalmente quando a infeção não é visível a olho nu.

Para conseguir esse objetivo, o segundo objetivo deste estudo é o de aplicar ou desenvolver metodologias que possam ser aplicadas não só na deteção do parasita, mas também em estudos epidemiológicos.

Os objetivos secundários passam essencialmente por avaliar a diversidade molecular dos parasitas encontrados em relação à descrita.

Capítulo III – Materiais e Métodos

Capítulo III- Materiais e Métodos

1 - Recolha das amostras:

As amostras estudadas foram obtidas, imediatamente após o sacrifício dos animais, nos matadouros de Pedrogão Grande e Leiria entre Dezembro de 2011 e Abril de 2012. O processo de recolha de amostras decorreu em condições de assepsia, de forma a limitar ao mínimo as contaminações. De cada animal selecionado para o estudo, foi recolhido 1 cm³ de fígado e pulmão, e conservado em etanol a 70%, tendo também sido registada informação sobre o sexo, idade e código de exploração do animal. A idade dos bovinos foi registada com base nos meses do animal e os ovinos classificados como adultos (mais de 12 meses) ou jovens (menos de 12 meses).

Foram recolhidas um total de 100 amostras (50 ovinos e 50 bovinos) a partir de um universo de 300 ovinos e 270 bovinos que foram abatidos nos matadouros nos dias em que se procedeu à recolha das amostras. A seleção dos animais de onde se recolheram as amostras foi feita de forma aleatória (para se poder estimar a prevalência das infeções) a cada 6 animais.

Em cada local de abate foram recolhidas 25 amostras de ovinos e 25 de bovinos que provinham de explorações da Zona Centro, Lisboa e vale do Tejo e Alentejo.

2 – Transporte e armazenamento das amostras

O transporte das amostras do matadouro para o laboratório foi efetuado numa arca térmica sem refrigeração no espaço máximo de duas horas após a sua obtenção. No laboratório, as amostras de fígado e pulmão, foram armazenadas a uma temperatura de 4°C até ao seu processamento.

3 – Processamento das amostras

Prepararam-se pools de amostras, pré-processamento, para conseguir uma amostra representativa de todo o universo amostral. Foram preparadas 20 pools no total, cada uma com 10 amostras: 10 de ovino (5 de pulmão e 5 de fígado) e 10 de bovino (5 de pulmão e 5 de fígado) de acordo com a tabela 1. Foram também escolhidas de forma aleatória 10 amostras de fígado, 5 de ovino (8, 25, 33, 66 e 98) e 5 de bovino (50, 52, 65, 78 e 81).

Tabela 1 – Constituição das pools de amostras.

Pool	Constituição (Nº da Amostra)	
	Ovinos	Bovinos
1	7; 8; 9; 10; 11; 21; 22; 23; 24 e 25.	1; 2; 3; 4; 5; 6; 12; 13; 14 e 15.
2	26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34 e 35.	16; 17; 18; 19; 20; 38; 39; 40; 41 e 42.
3	36; 37; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72 e 73.	43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51 e 52.
4	74; 75; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89 e 90.	53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61 e 62.
5	91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99 e 100.	63; 64; 65; 76; 77; 78; 79; 80; 81 e 82.

* - Cada pool para fígado e pulmão

4 – Extração de DNA

As amostras (individuais e pools) foram lavadas com PBS para remover o excesso de etanol. Posteriormente adicionou-se tampão de extração (50mM Tris-HCl, 50mM EDTA e 100mM NaCl, com pH ajustado a 8), SDS 10% em volume de cerca de 5% da solução final, para um tubo estéril de 1,5 ml, homogeneizou-se e incubou-se a 37°C em banho-maria, com agitação, durante 5 minutos.

Posteriormente adicionou-se proteinase K na concentração de 100mg/μl, homogeneizou-se e incubou-se a 37°C durante 90 minutos (com agitação), seguido de incubação a 56°C, durante mais 90 minutos.

De seguida adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico (25:24:1), homogeneizou-se e centrifugou-se a 13000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. Decantou-se o sobrenadante para outro tubo estéril de 1,5ml e a este adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico, homogeneizou-se e centrifugou-se a 13000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. No final voltou a retirar-se o sobrenadante para um novo tubo estéril de 1,5 ml, adicionando a este 0,1 volumes de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C. Incubou-se esta solução 30 minutos a -20°C, após o que se deixou a amostra estabilizar à temperatura ambiente e centrifugou-se durante 10 minutos a 13000rpm.

No final retirou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com etanol a 70%. Deixou-se repousar durante 5 minutos à temperatura ambiente, de seguida centrifugou-se a 13000 rpm durante 10 minutos, retirou-se o sobrenadante e deixou-se secar o precipitado à temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, adicionando água ultra pura. A solução com o DNA extraído foi guardada por cerca de 12 horas entre 2-8°C para estabilização do DNA, sendo posteriormente armazenada a -20°C.

5 – Quantificação de DNA

A quantificação de DNA foi realizada através do espectrofotómetro “GeneQuant pro” (Amersham Biosciences). Para cada doseamento foi utilizada uma quantidade de 10µL de amostra, após calibração com o tampão de eluição utilizado na extração do DNA, seguindo para os outros procedimentos as instruções do fabricante. Os resultados obtidos permitem verificar a concentração de DNA, o grau de pureza e a quantidade de sais de determinada amostra. A concentração de DNA é obtida em ng/µL, a um comprimento de onda de 260 nm, que juntamente com as medições efetuadas a comprimentos de onda de 230 e 280 nm permitem obter o grau de pureza (260/280nm) e a quantidade de sais (230/260 nm).

6 – Técnica de PCR

6.1 – “Primers” existentes na literatura

Para detecção de DNA dos parasitas usou-se a técnica de PCR, utilizando uma série de sequências iniciadoras (“primers”) localizadas em diferentes regiões do genoma, e descritos na literatura: gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade 1 (COI), Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) e Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) ribossomais.

Fragmentos do gene mitocondrial COI, que é bastante conservado, foram amplificados através de dois pares diferentes de “primers”. Os “primers” LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'), Folmer *et al.* (1994), amplificam um fragmento de aproximadamente 710pb do gene mitocondrial COI e são considerados genéricos, pois foram inicialmente descritos para a amplificação de espécies pertencentes a 11 filos de invertebrados, incluindo a *F. hepatica*.

Os “primers” JB3 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') e JB 4.5 (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'), desenhados por Bowles & McManus (1993), amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb, em trematodes e cestodes (Bowles, *et al.*, 1992).

As regiões ribossomais intergênicas transcritas ITS1 e ITS2 são consideradas como pouco conservadas e foram amplificadas em duas reações separadas.

Os “primers” BD1 (5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') e 4S (5'-TCTAGATGCGTTCGAA(G/A)TGTCGATG-3'), Bowles e McManus (1993), amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1 de trematodes e cestodes, e têm sido muito utilizados na genotipagem especialmente de espécies do género *Echinococcus*, seguido através de RFLP (Bowles, *et al.*, 1993c).

Os “primers” Dd58SF1 (5'-ATATTGCGGCCATGGGTTAG-3') e Dd28SR1 (5'-ACAAACAACCCGACTCCAAG-3'), Sharroks (1994) amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2), são considerados específicos para detecção de DNA de *Dicrocoelium spp*, sendo também utilizados para a diferenciação molecular entre *D. dendriticum* e *D. chinensis* (Otranto, *et al.*, 2007).

6.2 – Desenho de novos “primers” (para nested-PCR)

Durante este trabalho foram também desenhados novos primers localizados internamente aos primers existentes na literatura, para aumentar a sensibilidade da detecção de DNA dos parasitas, utilizando uma temperatura de *annealing* semelhante aos primers externos. Para desenhar os primers, alinou-se uma sequência da região alvo dos primers externos disponível na base de dados “GenBank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) com o programa “Biological Sequence alignment editor” (BioEdit v7.1.3), identificou-se a localização dos primers iniciais e escolheu-se os primers internos em locais com polimorfismos entre as diferentes espécies. A qualidade e propriedades dos primers foram verificadas com o auxílio do programa informático “Basic Local Alignment Search tool Primer-BLAST” (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), especificamente temperatura de desnaturação, e a probabilidade de auto-hibridação.

6.3 – Otimização da Técnica de PCR

6.3.1 – Otimização de PCR com os “primers” externos

As reações de PCR foram otimizadas antes da sua aplicação com as amostras para diagnóstico. Cada reação de 10 μ L tinha a seguinte constituição inicial: 1 μ L tampão de reação (10x; Bioline), 0,5 μ L MgCl₂ (40mM; Bioline), 2 μ L dNTPs (1mM; Bioline), *Taq* Polimerase 0,1 μ L (5U/ μ L; Bioline), 5 μ L água destilada e 0,5 μ L “primers” (0,25 μ L de forward e 0,25 μ L reverse, na concentração de 25pmol/ μ L) à qual foi adicionada 1 μ L de amostra.

Foi utilizado inicialmente um protocolo de PCR com 35 ciclos (desnaturação 95°C durante 1 minuto; *annealing* durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto), precedido por uma etapa de desnaturação a 98°C durante 5 minutos e finalizado com uma etapa de extensão a 72°C durante 10 minutos. A temperatura ótima de *annealing* dos “primers” foi definida através de réplicas de reações e recorrendo a um gradiente de temperatura (AVISO, GmbH Mechatronic Systems). Em todos os ensaios realizados foram utilizados controlos positivos (DNA purificado do parasita ou hospedeiro, exceto quando especificado) e negativos (água).

Dimetil sulfóxido (DMSO) foi usado a 5 e 10%, para melhorar a especificidade da reação de PCR quando necessário. O DMSO é um composto que devido às suas propriedades tem a capacidade de inibir a formação de estruturas secundárias durante o processo de amplificação, interferindo com a auto-complementaridade do DNA e minimizando a interrupção da síntese de DNA.

6.3.2 – Otimização de PCR com os “primers” internos

A mistura e condições de PCR utilizadas para as reações com estes “primers” foi a mesma dos “primers” externos e para a temperatura de *annealing* foram tidas em conta as temperaturas obtidas na otimização dos “primers” externos. Foram testados com DNA genómico e com produtos de amplificação com “primers” externos.

6.4 – Teste de sensibilidade da técnica de PCR

6.4.1 – “Primers” externos

Para verificar qual a quantidade mínima de DNA detetada e amplificada com o protocolo otimizado de PCR foi efetuada a amplificação com diluições sucessivas (1/1; 1/10; 1/100 e 1/1000) dos controlos positivos em água.

Testou-se a sensibilidade na presença do DNA do hospedeiro, através da amplificação de controlos positivos com DNA do hospedeiro em diluições seriadas em água (1/1, 1/10, 1/100 e 1/1000).

6.4.2 – “Primers” internos

Para cada par de primers internos foi testada a capacidade de estes amplificarem diretamente o DNA do parasita (como foi efetuado para os respetivos primers externos) e também a capacidade de estes amplificarem a partir dos produtos de amplificação das primeiras reações com os primers externos em diluições de 1 e 1:10 em água destilada. Incluíram-se sempre 2 controlos negativos e 2 positivos (em cada tipo de controlo foi incluído um com água destilada e outro com o produto do controlo da primeira reação).

6.5 – Teste de especificidade da técnica de PCR

Para garantir a especificidade da reação, e de cada par de primers, foi testada a possibilidade destes conseguirem amplificar o DNA do hospedeiro ou de outros parasitas, por isso, cada par de primers foi testado com DNA dos diferentes parasitas, em que não seria esperada amplificação, em diluições sucessivas (1, 1/10 e 1/100) e com o DNA do hospedeiro (ovino e bovino).

6.6 – Amplificação das amostras

Após o processo de otimização da técnica de PCR para cada par de primers procedeu-se à amplificação das várias amostras (amostras individuais e pools) usando as condições consideradas ótimas.

7 – Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em solução tampão TAE (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH8,0) com 100µL de Brometo de etídio/L de tampão.

A migração das moléculas de DNA foi avaliada por comparação com as de um marcador de tamanho molecular de 2000pb (Hyper Ladder II, Bioline). Usou-se 5 µL de produto da amplificação com 1µL solução azul de bromofenol em glicerol. A migração foi feita a 100V, durante aproximadamente 30 minutos. Os fragmentos de DNA foram visualizados num transiluminador sob luz ultravioleta (AlphaImager HP, AlphInnotech) com câmara fotográfica incorporada, fotografados e analisados através do programa informático Alphaview (AlphaInnotech).

8 – Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR para sequenciação foram purificados com o kit “QIAquick PCR purification kit” da QIAGEN (de acordo com as instruções do fabricante). Resumidamente, foram adicionados 5 volumes de tampão de purificação a um volume da reação de PCR e esta solução foi vertida para o interior de uma coluna QIAquick. O DNA liga-se à membrana de sílica (quando existem grandes concentrações de sal) enquanto as impurezas passam através da coluna sendo adicionado um tampão de lavagem para ajudar este processo. Finalmente foi adicionado um tampão de eluição (30 μ L) que induz o DNA a desligar-se da membrana de sílica.

Os fragmentos purificados foram sequenciados pela empresa STAB VIDA (Portugal), através do método de Sanger, usando os primers que haviam sido usados para a amplificação inicial.

9- Análise filogenética das sequências de DNA

As sequências nucleotídicas parciais obtidas (forward e reverse) de cada fragmento foram analisadas e corrigidas manualmente com o programa “Chromas lite” (Technelysium). As sequências com qualidade suficiente foram alinhadas com o programa BioEdit v7.1.3, de modo a gerar uma única sequência consenso para cada amostra. A sequência obtida foi usada para pesquisar a existência de outras sequências semelhantes na base de dados GenBank através do programa “BLAST”.

Todas as sequências das regiões amplificadas dos parasitas estudados foram retiradas para o programa BioEdit onde foram alinhadas e editadas, para posterior análise filogenética através do programa SplitsTree4, usando distâncias calculadas através de Kimura-2-Parameter no algoritmo Neighbor-Net.

10 – Análise estatística

O cálculo do número ideal de amostras para o estudo em questão e da margem de erro do estudo, foi efetuado com base no efetivo bovino e ovino de Portugal, utilizando o calculador online “Sample size calculator” (Raosoftinc. <http://www.raosoft.com/samplesize.html>), com base no número total do efetivo ovino e bovino em Portugal, a prevalência estimada, a margem de erro e o nível de confiança.

A prevalência foi calculada com base na detecção que foi feita via PCR e efetuada no matadouro pelo inspetor sanitário, através do exame visual da carcaça. Os limites de confiança associados ao valor de prevalência, para um erro de 95%, foram estimados utilizando o programa “EpiTools epidemiological calculators” (Australian Biosecurity Cooperative Research Centre, (<http://epitools.ausvet.com.au>), com recurso ao método de “Jeffreys” (Brown, *et al.*, 2001).

Capítulo IV – Resultados

Capítulo IV - Resultados:

1 – As amostras

Durante o processo de colheita foram obtidas amostras de 100 animais, 50 ovinos e 50 bovinos, sendo que, em cada matadouro foram recolhidas amostras de 25 ovinos e 25 bovinos. Os ovinos incluídos neste estudo tinham uma idade que variava entre os 2 e os 19 meses e no momento da colheita foi impossível determinar o seu sexo. Os bovinos, à data do abate, tinham uma idade que variava entre os 10 e os 29 meses, com uma idade média de 14 meses, 27 eram do sexo masculino (54%) e 23 do sexo feminino (46%). Quanto às explorações de origem dos animais, estas encontram-se na Zona Centro, Lisboa e vale do Tejo e Alentejo (Tabela 2), sendo a grande maioria dos bovinos proveniente da região de Lisboa e Vale do Tejo e Alentejo, e a maioria dos ovinos da Zona Centro e Alentejo. O número de animais (ovinos e bovinos) provenientes do Alentejo foi o mesmo, 18.

Tabela 2 – Descrição do número de animais analisados proveniente de cada região por espécie.

Espécie		Zona Centro	Lisboa e Vale do Tejo	Alentejo	Nº Total
Bovinos	n	6	26	18	50
	%	12%	52%	36%	
Ovinos	n	21	11	18	50
	%	42%	22%	36%	
Total	n	27	37	36	100



Figura 14: Mapa de Portugal com as regiões estudadas e o número de animais de cada região abatidos em cada matadouro.

2 – Extração e quantificação de DNA

As concentrações de DNA obtidas variaram entre 184,2ng/μL e 258,6ng/μL, com um valor médio de 239,19ng/μL. Os valores do grau de pureza variaram entre 1,092 e 1,792, com um valor médio de 1,22. A quantidade de sais registou valores entre 0,817 e 1,409, com média de 1 (ver Anexo II, Tabelas 6 a 13, na página 158).

3 – Otimização da técnica de PCR

3.1 – Amplificação do gene mitocondrial COI com os ““Primers”” LCO1490/HCO2198

Os “Primers” LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994), estão descritos como “Primers” universais para 11 filos de invertebrados, incluindo os platelmintes, e amplificam um fragmento de aproximadamente 710pb do gene COI (Folmer, *et al.*, 1994). Foram testados para amplificação de DNA dos três parasitas pesquisados no âmbito deste projeto (*F. hepatica*, *E. granulosus* e *D. dendriticum*) e de DNA do hospedeiro (ovinos e bovinos). Das três temperaturas testadas (40°C, 50°C e 60°C), ocorreu amplificação a 40°C e 50° de DNA do hospedeiro (ovino e bovino) e das amostras de DNA de ovino e bovino com DNA de *F. hepatica* (1:1), como se pode observar na figura 15, sendo que, o DNA de bovino apenas foi amplificado numa réplica (Figura 16). Não foi registado qualquer produto de amplificação a partir de DNA purificado (controlo positivo) dos três parasitas estudados (Figuras 15, 16 e 17).

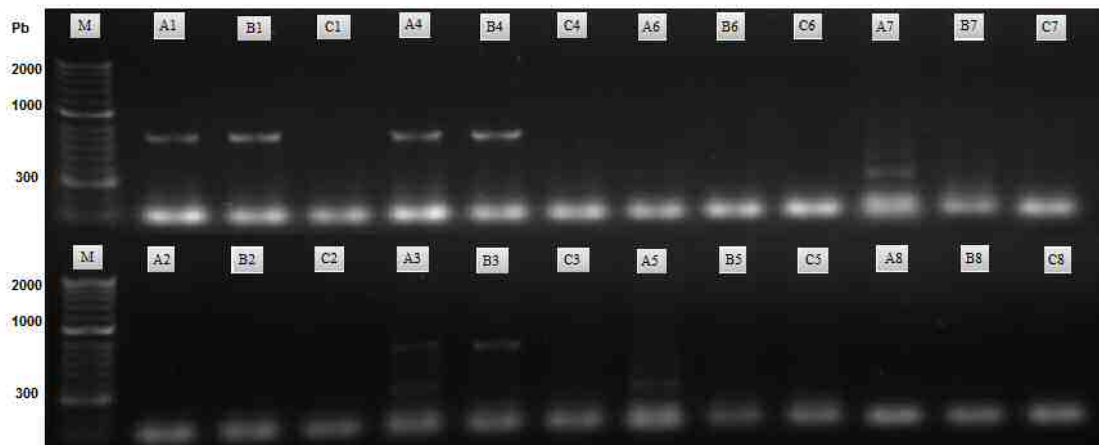


Figura 15: Resultados de PCR com ““Primers”” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI. Amostras: 1- Ovino; 2- Bovino; 3- Bovino + *F. hepatica* (1:1); 4- Ovino + *F. hepatica* (1:1); 5- Bovino + *F. hepatica* (1:10); 6-Ovino + *F. hepatica* (1:10); 7- Controlo Positivo (DNA de *F. hepatica*) e 8- Controlo negativo. M - marcador. Temperaturas de *annealing*: A: 40°C; B: 50°; C: 60°C.



Figura 16: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI. Amostras: 1- *F. hepatica* 1; 2- *F. hepatica* 1 (1:10); 3- *F. hepatica* 1 (1:100); 4- *F. hepatica* 2; 5- *F. hepatica* 2 (1:10); 6- *F. hepatica* 2 (1:100); 7- DNA bovino e 8- Controlo negativo. M - marcador. Temperaturas de *annealing*: A: 40°C; B: 50°C; C: 60°C.

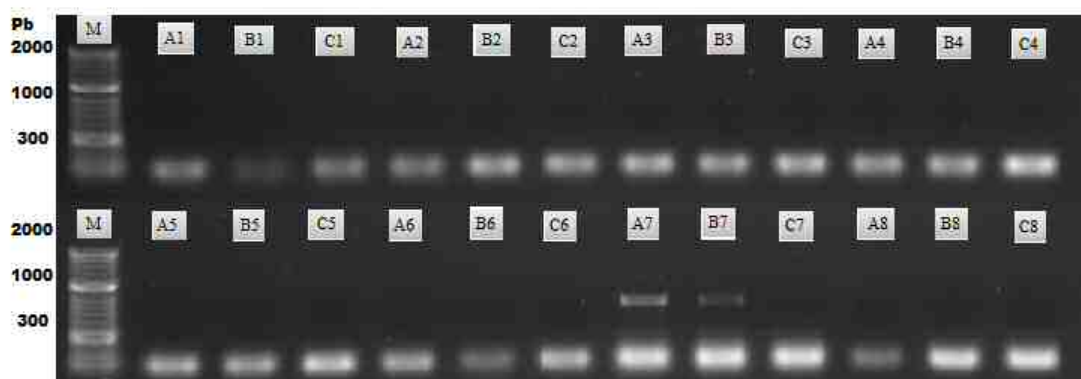


Figura 17: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI. Amostras: 1- *E. granulosus*; 2- *E. granulosus* (1:10); 3- *D. dendriticum* 1; 4- *D. dendriticum* 1 (1:10); 5- *D. dendriticum* 2; 6- *D. dendriticum* 2 (1:10); 7- Controlo positivo (DNA do hospedeiro) e 8- Controlo negativo. M - marcador. Temperaturas de *annealing*: A: 40°C; B: 50°C; C: 60°C.

Após a otimização das condições de amplificação de DNA por PCR com os “Primers” LCO1490/HCO2198 procedeu-se ao processamento das amostras individuais e das pools de fígado e pulmão (Figuras 18 e 19, respetivamente), à temperatura de 50°C.

Observou-se a presença de um fragmento de tamanho compatível com o esperado aproximadamente 700pb na pool 3 de fígados de ovino, na amostra 50 e 81 de

fígado de bovino e em todas as pools de fígado de bovino. Em relação às amostras e pools de pulmão de ovino e bovino todas elas foram negativas, com exceção da amostra 65 (pulmão de bovino). Posteriormente foi repetida a amplificação de todas as amostras e pools testadas, tendo o resultado sido negativo para todas incluindo o controlo positivo. Para controlo da qualidade de DNA usado, foram feitas novas extrações das amostras individuais (ver Anexo II, tabelas 14 e 15, na página 158), tendo o resultado de PCR sido negativo de novo incluindo para o controlo positivo (Figura 20).

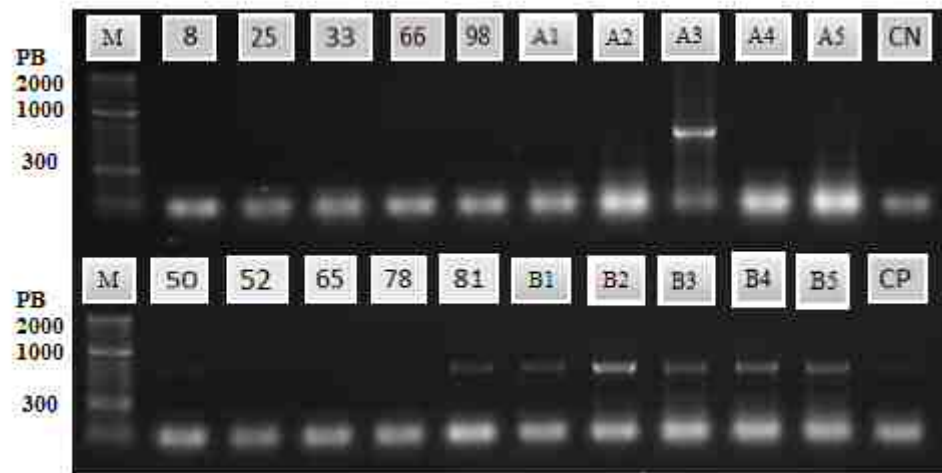


Figura 18: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI. Amostras: 8, 25, 33, 66 e 98- ovino (fígado); A1- Pool 1 de fígado de ovino; A2- Pool 2 de fígado de ovino; A3- Pool 3 de fígado de ovino; A4- Pool 4 de fígado de ovino; A5- Pool 5 de fígado de ovino. 50, 52, 65, 78 e 81- Amostras de bovino (fígado). B1- Pool 1 de fígado de bovino; B2- Pool 2 de fígado de bovino; B3- Pool3 de fígado de bovino; B4- Pool 4 de fígado de bovino e B5- Pool 5 de fígado de bovino; CN- Controlo negativo e CP- Controlo positivo. M - marcador.

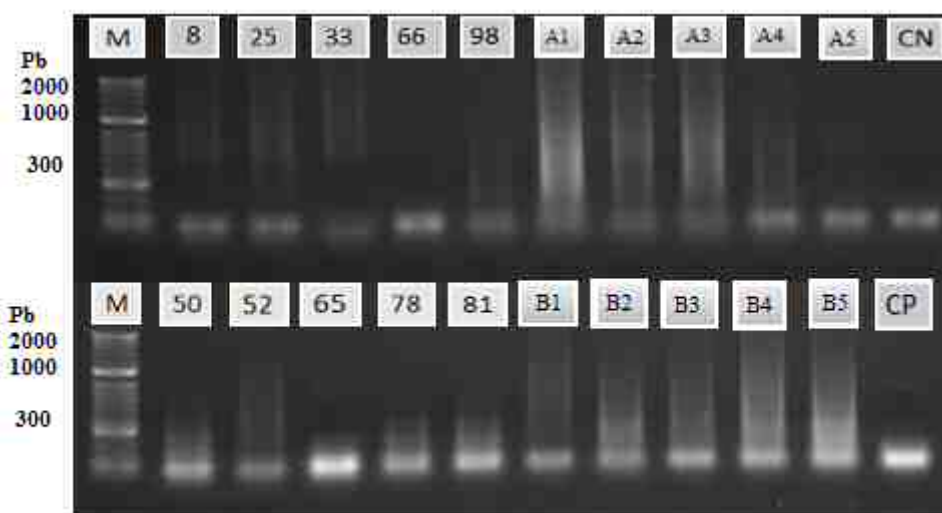


Figura 19: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI. Amostras: 8, 25, 33, 66 e 98- Ovino (Pulmão); A1- Pool 1 de pulmão de ovino; A2- Pool 2 de pulmão de ovino; A3- Pool 3 de pulmão de ovino; A4- Pool 4 de pulmão de ovino; A5- Pool 5 de pulmão de ovino. 50, 52, 65, 78 e 81- Bovino (Pulmão). B1- Pool 1 de pulmão bovino; B2- Pool 2 de pulmão bovino; B3- Pool 3 de pulmão de bovino; B4- Pool 4 de pulmão de bovino e B5- Pool 5 de pulmão de bovino; CN- Controlo negativo e CP- controlo positivo. M - marcador.



Figura 20: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI. Amostras: 8, 25, 33, 66 e 98 – ovino (fígado); 50, 52, 65, 78 e 81- Amostras de bovino (fígado). M - marcador.

3.2 – Amplificação do gene mitocondrial COI com os “Primers” JB3/JB4.5

Os “Primers” JB3/JB4.5 (Bowles & McManus, 1993) amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene mitocondrial COI. Sendo amplamente utilizados na investigação da variação intra e interespecífica de trematodes e cestodes (Bowles, *et al.*, 1992).

Inicialmente testou-se a capacidade dos “Primers” amplificarem o referido fragmento, a 3 temperaturas diferentes (40°C, 50°C e 60°C), com DNA dos hospedeiros (ovino e bovino) e dos 3 parasitas estudados (*F. hepatica*, *E. granulosus* e *D. dendriticum*). Não houve amplificação do DNA do hospedeiro a nenhuma temperatura e a melhor temperatura de *annealing* para amplificar o DNA de *F. hepatica* foi de 50°C (Figuras 21 e 22).

Como ocorreu a amplificação de DNA de *F. hepatica* procedeu-se ao teste de sensibilidade, assim como para *E. granulosus* com diferentes diluições (1:10; 1:100 e 1:1000) do DNA dos parasitas em água destilada. Ocorreu amplificação de *F. hepatica* e *E. granulosus* em diluições de até 1:10 (figuras 23 e 24). Em *D. dendriticum* não se registou amplificação com este par de primers, apesar de terem sido testadas duas amostras diferentes de DNA do parasita a 3 temperaturas diferentes (40, 50 e 60°C), como se pode ver nas figuras 25 e 26.

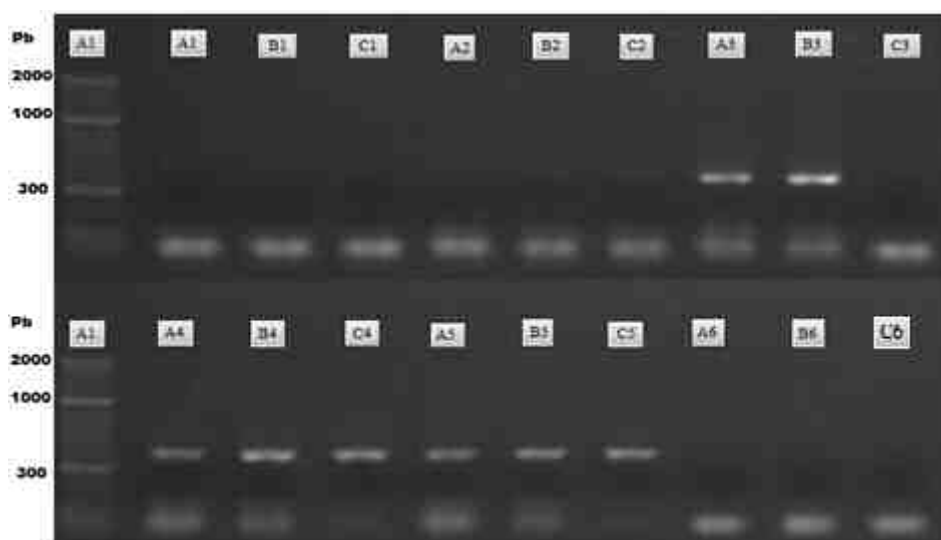


Figura 21: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI. Amostras: 1- Ovino; 2- Bovino; 3- *F. hepatica* 1 (1:10); 4- *F. hepatica* 2; 5- *F. hepatica* 2 (1:10); 6- C. negativo. M: marcador. Temperaturas de annealing: A: 40°C; B: 50°; C: 60°C.



Figura 22: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI. Amostras: 1- Amostra 50 + *F. hepatica* (1:100); 2- Amostra 50 + *F. hepatica* (1:1000); 3- Amostra 52 + *F. hepatica* (1:100); 4- Amostra 52 + *F. hepatica* (1:1000); 5- Amostra 65 + *F. hepatica* (1:100); 6- Amostra 65 + *F. hepatica* (1:1000); 7- Amostra 78 + *F. hepatica* (1:100); 8- Amostra 78 + *F. hepatica* (1:1000); 9- Amostra 81 + *F. hepatica* (1:100); 10- Amostra 81 + *F. hepatica* (1:1000); 11- Controlo Positivo; 12- *D. dendriticum* 1; 13- *D. dendriticum* 2; 14- Fígado suspeito de estar contaminado com *E. granulosus* 1; 15- fígado suspeito de estar contaminado com *E. granulosus* 2; 16- Controlo Positivo; 17- Controlo negativo. M - marcador. Temperaturas de *annealing*: 60°C.

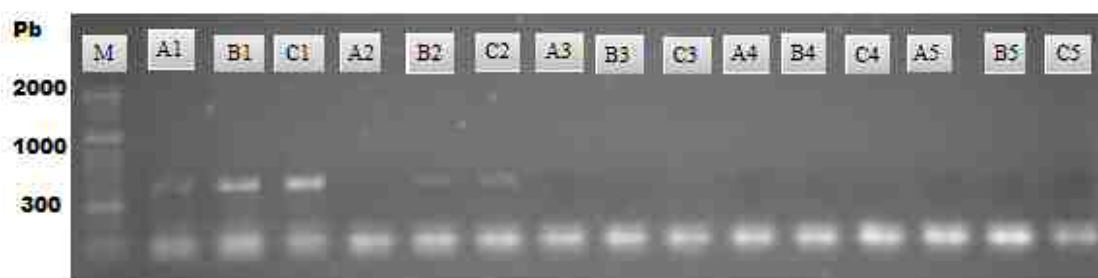


Figura 23: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI. Amostras: 1- *F. hepatica*; 2- *F. hepatica* (1:10); 3- *F. hepatica* (1:100); 4- *F. hepatica* (1:1000); 5- C. negativo. M: marcador. Temperaturas de *annealing*: A: 40°C; B: 50°; C: 60°C.

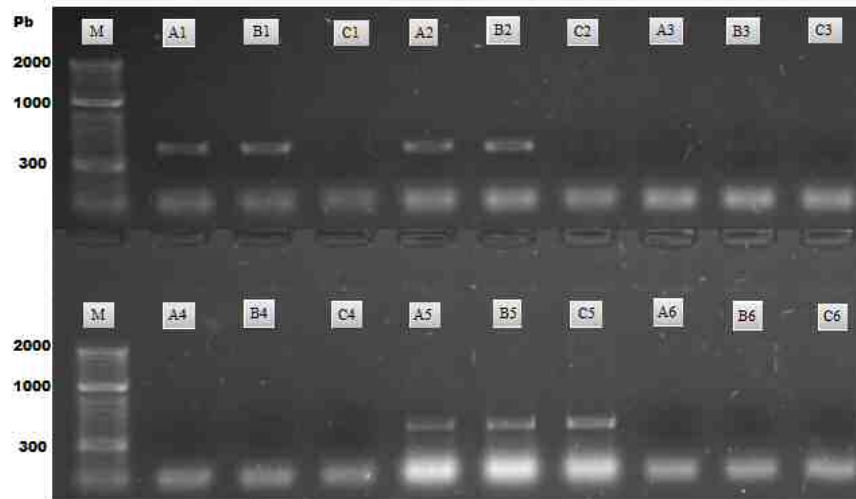


Figura 24: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI. Amostras: 1- *E. granulosus*; 2- *E. granulosus* (1:10); 3- *E. granulosus* (1:100); 4- *E. granulosus* (1:1000); 5- C. Positivo; 6- Controlo negativo. M - marcador. Temperaturas de *annealing*: A: 40°C; B: 50°C; C: 60°C.

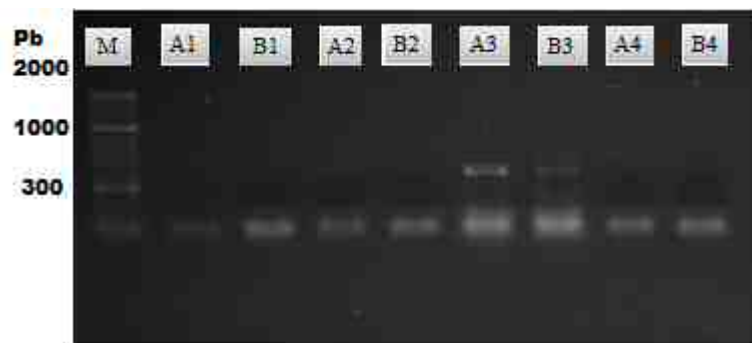


Figura 25: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI. Amostras: 1- *D. dendriticum* 1; 2- *D. dendriticum* 2; 3- Controlo Positivo; 4- Controlo negativo. M - marcador. Temperaturas de *annealing*: A: 40°C; B: 50°C.

Testou-se também a amplificação de DNA do parasita (*F. hepatica* e *E. granulosus*) na presença de DNA do hospedeiro (fígado) em diferentes diluições (1:10; 1:100 e 1:1000), a 3 temperaturas diferentes, para verificar a capacidade de deteção do DNA dos parasitas em amostras que contenham uma mistura de DNA do hospedeiro e do parasita. Ocorreu amplificação de *F. hepatica* em diluições de até 1:100 (figuras 22 e 26), mas não quando *E. granulosus* foi testado, nem mesmo o controlo positivo (figura 27). Posteriormente esta reação foi repetida, verificando-se o mesmo resultado.

Quando se testou as amostras de fígado de ovino e bovino (individuais e pools) com uma temperatura considerada ótima de *annealing* de 50°C, em nenhuma se conseguiu detetar a presença de fragmentos de amplificação (figuras 28 e 29), mas sim no controlo positivo.



Figura 26: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI. Amostras: 1- Amostra 50 + *F. hepatica* (1:10); 2- Amostra 52 + *F. hepatica* (1:10); 3- Amostra 65 + *F. hepatica* (1:10); 4- Amostra 78 + *F. hepatica* (1:10); 5- Amostra 81 + *F. hepatica* (1:10); 6- Controlo Positivo; 7- Controlo negativo; 8- Amostra 78; M - marcador. Temperaturas de *annealing*: A: 40°C; B: 50°C; C: 60°C.

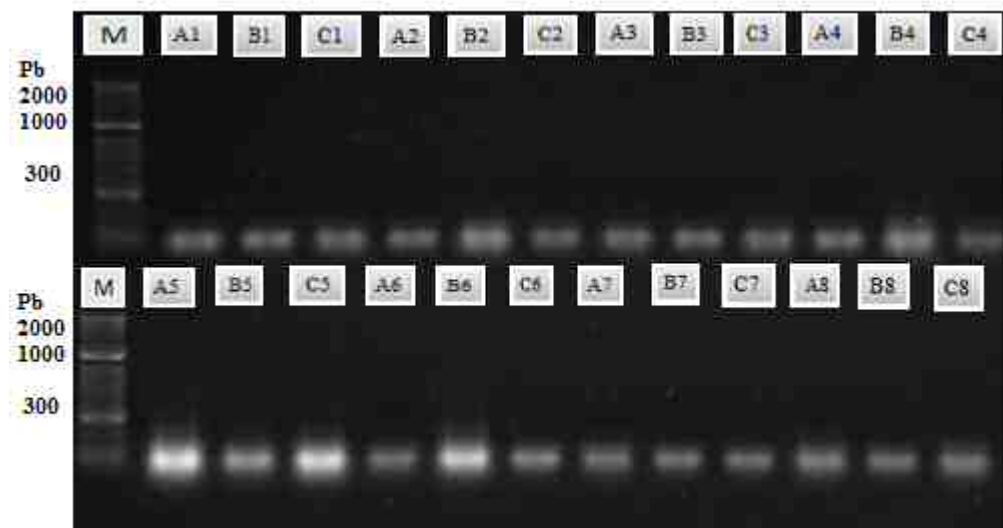


Figura 27: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI. Amostras: 1- bovino + *E. granulosus* (1:1); 2- bovino + *E. granulosus* (1:10); 3- bovino + *E. granulosus* (1:100); 4- Controlo negativo); 5- ovino + *E. granulosus* (1:1); 6- ovino + *E. granulosus* (1:10); 7- ovino + *E. granulosus* (1:100); 8- Controlo positivo (DNA de *E. granulosus*). M - marcador. Temperaturas de *annealing*: A: 40°C; B: 50°C; C: 60°C.

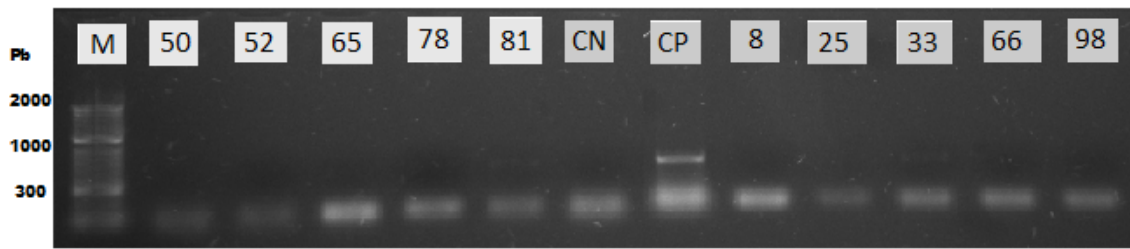


Figura 28: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI. Amostras: 50, 52, 65, 78 e 81- Bovino (fígado); 8, 25, 33, 66 e 98- Ovino (fígado); CN- Controlo negativo; CP- Controlo positivo. M - marcador. Temperatura de *annealing*: 50°.

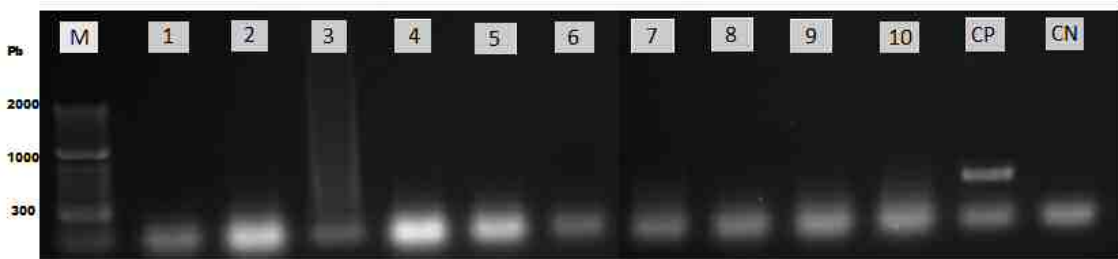


Figura 29: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI. Amostras: 1- Pool 1 fígado de ovino; 2- Pool 2 fígado de ovino; 3- Pool 3 de fígado de ovino; 4- Pool 4 de fígado de ovino; 5- Pool 5 de fígado de ovino; 6- Pool 1 fígado de bovino; 7- Pool 2 fígado de bovino; 8- Pool 3 de fígado de bovino; 9- Pool 4 de fígado de bovino; 10- Pool 5 de fígado de bovino; CP- Controlo Positivo; CN- Controlo Negativo. M - marcador. Temperatura de *annealing*: 50°.

3.3 - Amplificação da região ribossomal ITS1 com os “Primers” BD1/4S:

Os “Primers” BD1/4S (Bowles & McManus, 1993) foram desenhados para amplificação de um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1 de trematodes e cestodes, em especial de espécies do género *Echinococcus* e têm sido muito utilizados na sua tipagem através de RFLP.

Inicialmente testou-se a capacidade dos “Primers” amplificarem o referido fragmento a 3 temperaturas diferentes (40, 50 e 60°C), com DNA dos hospedeiros (ovino e bovino) e dos 3 parasitas estudados (*F. hepatica*, *E. granulosus* e *D. dendriticum*), testando também uma diluição (1:10), em água destilada, dos mesmos. Constatou-se que em todas as amostras testadas, com exceção do DNA de bovino,

ocorreu amplificação de DNA. Na grande maioria das amostras ocorreu a amplificação de vários fragmentos de DNA, com o aparecimento de bandas inespecíficas, tendo inclusive o controlo negativo sido positivo (Figura 30).

Para aumentar a especificidade das reações foi testada uma temperatura de *annealing* superior (65°C), servindo a de 60°C como uma temperatura de controlo e testando também a utilização de DMSO a 5 e 10% (figura 31). Verificou-se que a 60°C e 65°C com a utilização de 5% de DMSO as bandas inespecíficas desapareceram, o controlo negativo foi negativo e o único parasita amplificado pelos primers BD1/4S foi *F. hepatica* (figura 31). Como tal, as reações seguintes foram realizadas com uma temperatura de *annealing* de 60°C e com 5% de DMSO.

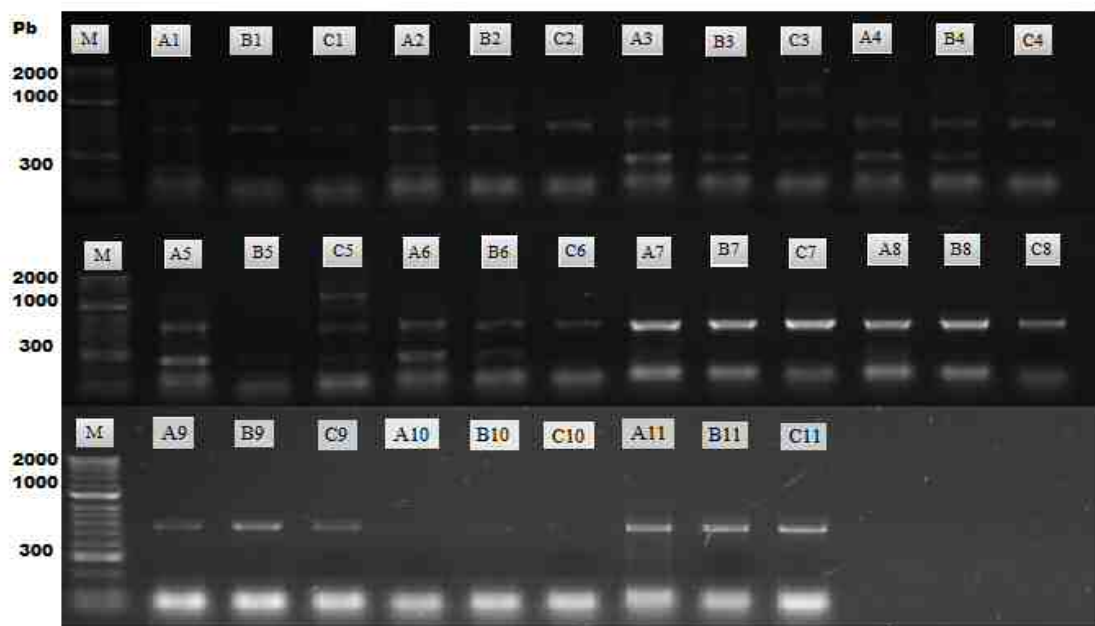


Figura 30: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1. Amostras: 1- *E. granulosus*; 2- *E. granulosus* (1:10); 3- *D. dendriticum* 1; 4- *D. dendriticum* 1 (1:10); 5- *D. dendriticum* 2; 6- *D. dendriticum* 2 (1:10); 7- *F. hepatica*; 8- *F. hepatica* (1:10); 9- Ovino; 10- Bovino; 11- Controlo negativo. M - marcador. Temperaturas de *annealing*: A:40°C, B:50° e C:60°C.

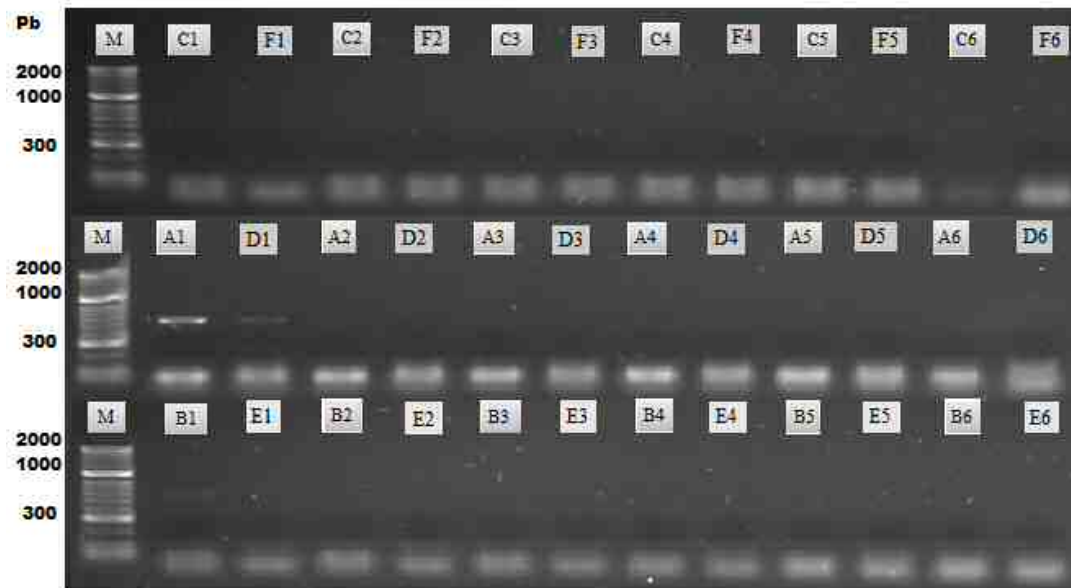


Figura 31: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1. Amostras: 1- *F. hepatica*; 2- *E. granulosus*; 3- *D. dendriticum*; 4- Controlo negativo; 5- Ovino; 6- Bovino. M: Marcador. A- 5% DMSO a 60°C; B- 10% DMSO a 60°C; C- Sem DMSO a 60°C; D- 5% DMSO a 65°C; E- 10% DMSO a 65°C; F- Sem DMSO a 65°C.

Após se otimizar as condições de PCR procedeu-se ao teste de sensibilidade onde foram amplificadas diluições de DNA de *F. hepatica* (1:10; 1:1000 e 1:10000) a 60°C com 5% de DMSO e verificou-se que os “Primers” tinham a capacidade de amplificar até à diluição de 1:100 (Figura 32). À semelhança do que aconteceu para os “Primers” JB3/JB4.5 foi também testada a possibilidade de a presença de DNA do hospedeiro inibir a reação, e como tal, efetuou-se a amplificação de DNA do parasita com DNA do hospedeiro em diferentes diluições (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000) à temperatura de 60°C com 5% de DMSO. Verificou-se que não ocorreu qualquer amplificação, nem mesmo no controlo positivo (DNA de *F. hepatica*), tendo a reação sido repetida com o mesmo resultado (Figura 33).

O processamento das amostras de fígado de ovino e bovino (individuais e pools) foi efetuada a uma temperatura de *annealing* de 60°C com 5% DMSO, e em nenhuma foi detetada a presença de fragmentos do DNA alvo (Figura 34), sendo amplificado no controlo positivo.

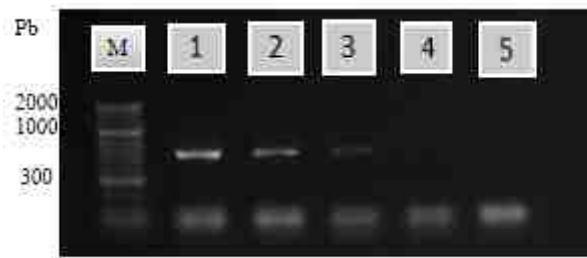


Figura 32: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1. Amostras: 1- *F. hepatica*; 2- *F. hepatica* (1:10); 3- *F. hepatica* (1:100); 4- *F. hepatica* (1:1000) e 5- Controlo negativo. M: marcador.



Figura 33: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1. Amostras: 1- *F. hepatica* + ovino (1:1); 2- *F. hepatica* + ovino (1:10); 3- *F. hepatica* + ovino (1:100); 4- *F. hepatica* + ovino (1:1000); 5- *F. hepatica* + bovino (1:1); 6- *F. hepatica* + bovino (1:10); 7- *F. hepatica* + bovino (1:100); 8- *F. hepatica* + bovino (1:1000); CN- Controlo negativo; CP- Controlo Positivo. M: marcador.

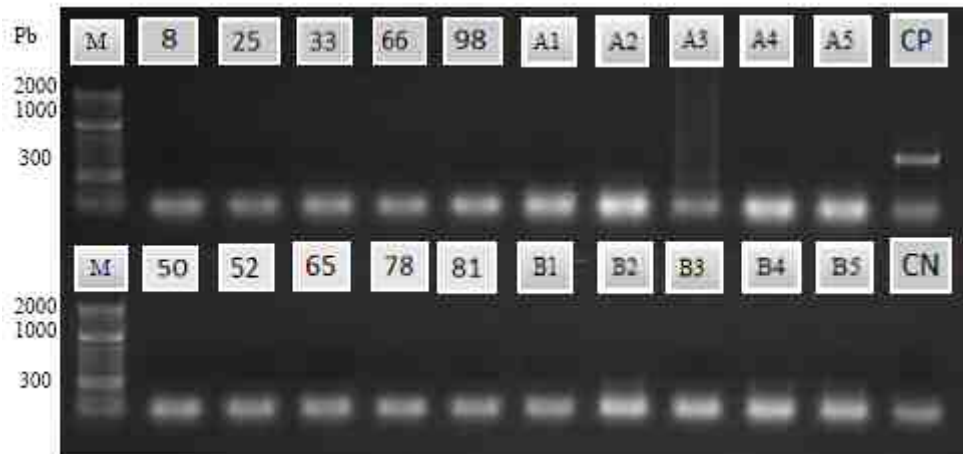


Figura 34: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1. Amostras: 8, 25, 33, 66 e 98- amostras individuais de ovino; A1- Pool 1 de fígado de ovino; A2- Pool 2 de fígado de ovino; A3- Pool 3 de fígado de ovino; A4- Pool 4 de fígado de ovino; A5- Pool 5 de fígado de ovino; 50, 52, 65, 78 e 81- amostras individuais de bovino; B1- Pool 1 de fígado de bovino; B2- Pool 2 de fígado de bovino; B3- Pool 3 de fígado de bovino; B4- Pool 4 de fígado de bovino e B5- Pool 5 de fígado de bovino. M: Marcador. CN- Controlo negativo; CP- Controlo Positivo

3.4 - Amplificação da região ribossomal ITS2 com os “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1

Os “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 (Sharroks, A.D., 1994) amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2, e estão descritos como amplificando especificamente DNA de *D. dendriticum*, sendo também utilizados para a diferenciação molecular entre *D. dendriticum* e *Dicrocoelium chinensis* (Otranto, *et al.*, 2007).

Inicialmente testou-se a capacidade dos “Primers” amplificarem o referido fragmento, a 3 temperaturas diferentes (40°C, 50°C e 60°C), com DNA dos hospedeiros (ovino e bovino) e dos 3 parasitas estudados (*F. hepatica*, *E. granulosus* e *D. dendriticum*), testando também uma diluição (1:10), em água destilada, dos mesmos. Verificou-se que os “Primers” têm a capacidade de amplificar *D. dendriticum* e *F. hepatica*, mas surgiram várias bandas inespecíficas nas temperaturas mais baixas (40°C e 50°C) e o controlo negativo foi positivo às temperaturas de 40°C e 50°C (Figura 35).

Tentou-se melhorar a especificidade da reação através do aumento da temperatura de *annealing* de 60°C para 65°C e da utilização de diferentes concentrações de DMSO (5% e 10%) às referidas temperaturas. As melhores condições, para a amplificação de *F. hepatica* e *D. dendriticum*, foram a 60 ou 65°C com a utilização de 5% de DMSO (Figura 36).

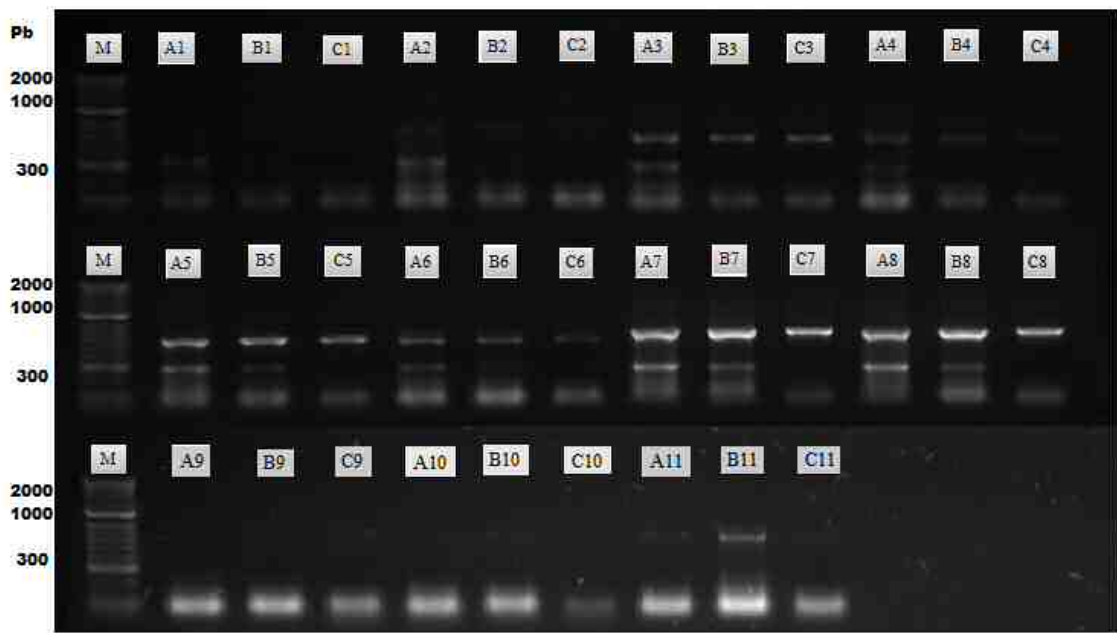


Figura 35: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2. Amostras: 1- *E. granulosus*; 2- *E. granulosus* (1:10); 3- *D. dendriticum* 1; 4- *D. dendriticum* 1 (1:10); 5- *D. dendriticum* 2; 6- *D. dendriticum* 2 (1:10); 7- *F. hepatica*; 8- *F. hepatica* (1:10); 9- Ovino; 10- Bovino; 11- Controlo negativo. M - marcador. Temperaturas de *annealing*: A: 40°C, B: 50° e C: 60°C.

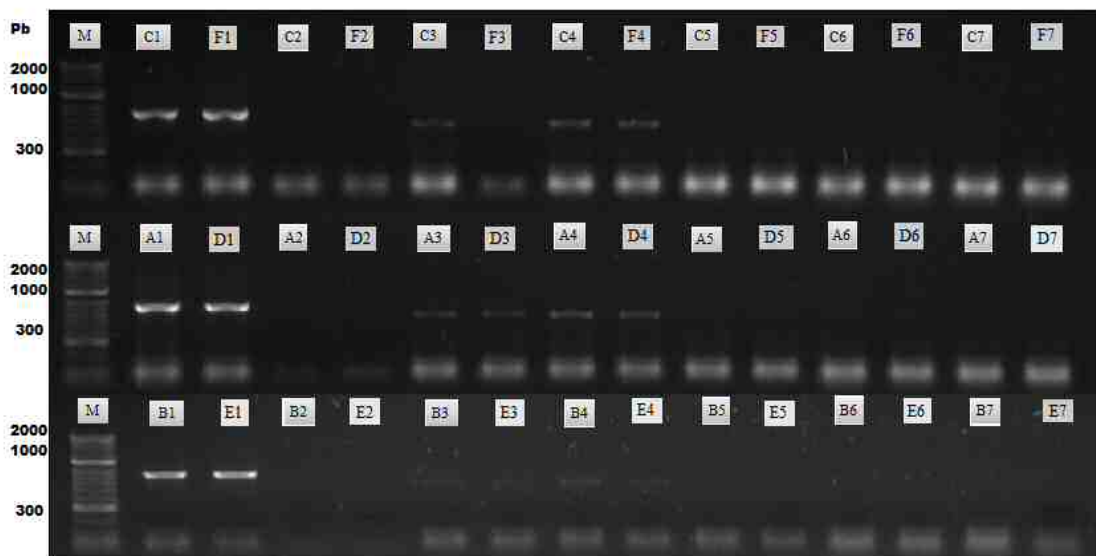


Figura 36: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2. Amostras: 1- *F. hepatica*; 2- *E. granulosus*; 3- *D. dendriticum* 1; 4- *D. dendriticum* 2; 5- Controlo negativo; 6- Ovino; 7- Bovino. M: Marcador. A- 5% DMSO a 60°C; B- 10% DMSO a 60°C; C- Sem DMSO a 60°C; D- 5% DMSO a 65°C; E- 10% DMSO a 65°C; F- Sem DMSO a 65°C.

Posteriormente testou-se a sensibilidade, tendo sido usadas diluições de DNA de *F. hepatica* e *D. dendriticum* em água destilada (1:10; 1:100 e 1:1000) a 60°C com 5% de DMSO. Verificou-se que o DNA de *F. hepatica* era amplificado em diluições de até pelo menos 1:1000 e o de *D. dendriticum* em diluições até 1:10 (Figura 37).

Foi também testada a possibilidade de a presença de DNA do hospedeiro inibir a reação, e como tal, efetuou-se a amplificação de DNA dos parasitas (*F. hepatica* e *D. dendriticum*) com DNA do hospedeiro em diferentes diluições (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000) à temperatura de 60°C com 5% de DMSO. Não houve qualquer amplificação, incluindo o controlo positivo (DNA de *D. dendriticum*), nem quando o procedimento foi novamente executado (Figura 38).

Após se efetuar a otimização da técnica de PCR foram testadas as amostras de fígado de ovino e bovino (individuais e pools) com uma temperatura de *annealing* de 60°C com 5% DMSO, e em nenhuma foi detetada a presença de fragmentos do DNA alvo (Figura 39).

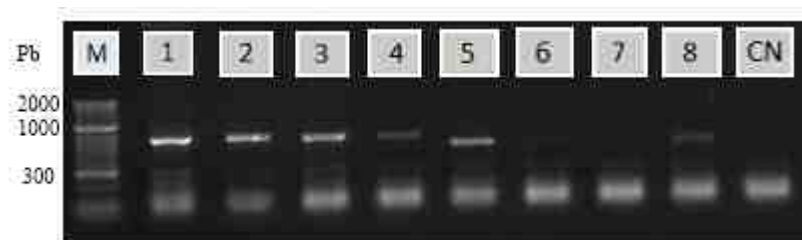


Figura 37: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2. Amostras: 1- *F. hepatica*; 2- *F. hepatica* (1:10); 3- *F. hepatica* (1:100); 4- *F. hepatica* (1:1000); 5- *D. dendriticum*; 6- *D. dendriticum* (1:10); 7- *D. dendriticum* (1:100), 8- *D. dendriticum* (1:1000) e 8- Controlo negativo. M: Marcador.



Figura 38: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2. Amostras: 1- *F. hepatica* + ovino (1:1); 2- *F. hepatica* + ovino (1:10); 3- *F. hepatica* + ovino (1:100); 4- *F. hepatica* + ovino (1:1000); 5- *F. hepatica* + bovino (1:1); 6- *F. hepatica* + bovino (1:10); 7- *F. hepatica* + bovino (1:100); 8- *F. hepatica* + bovino (1:1000); 9- *D. dendriticum* + ovino (1:1); 10- *D. dendriticum* + ovino (1:10); 11- *D. dendriticum* + ovino (1:100); 12- *D. dendriticum* + ovino (1:1000); 13- *D. dendriticum* + bovino (1:1); 14- *D. dendriticum* + bovino (1:10); 15- *D. dendriticum* + bovino (1:100); 16- *D. dendriticum* + bovino (1:1000); CN- Controlo negativo; CP- Controlo Positivo. M: Marcador.

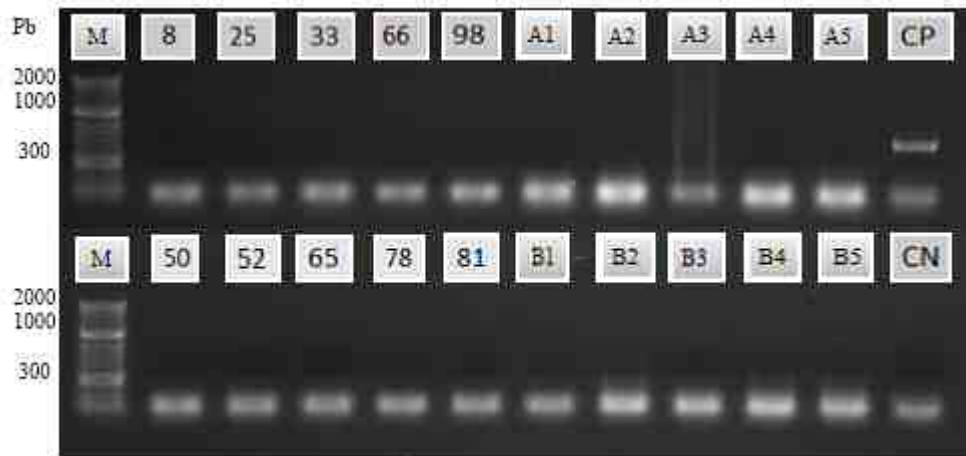


Figura 39: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2. Amostras: 8, 25, 33, 66 e 98- amostras individuais de ovino; A1- Pool 1 de fígado de ovino; A2- Pool 2 de fígado de ovino; A3- Pool 3 de fígado de ovino; A4- Pool 4 de fígado de ovino; A5- Pool 5 de fígado de ovino; 50, 52, 65, 78 e 81- amostras individuais de fígado de bovino; B1- Pool 1 de fígado de bovino; B2- Pool 2 de fígado de bovino; B3- Pool 3 de fígado de bovino; B4- Pool 4 de fígado de bovino e B5- Pool 5 de fígado de bovino. M: Marcador.

4 – Desenvolvimento de “Primers” internos para nested PCR

Para aumentar a sensibilidade e a especificidade da detecção de DNA dos 3 parasitas estudados foram desenhados primers internos aos primers existentes na literatura, utilizando uma temperatura de *annealing* semelhante, para os três alvos em estudo: COI, ITS1 e ITS2.

Os primers JB3/JB4.5 amplificam o gene mitocondrial COI em duas das espécies estudadas neste projeto, assim como provavelmente outros parasitas helmintas. Por isso foram desenhados os primers JB3n-Eg/JB4.5n-Eg e JB3n-Fh/JB4.5n-Fh para amplificar um fragmento de aproximadamente 300pb do gene mitocondrial COI de *E. granulosus* e *F. hepatica*, respetivamente (figura 40 e 41, respetivamente, e tabela 3).

O primer Dd58SF1n1 foi desenhado para ser utilizado com o primer Dd28SR1 (5'- ACAAACAACCCGACTCCAAG-3'), amplificando um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2 de *Dicrocoelium dendriticum*, interior aos primers Dd58SF1/Dd28RF1 (figura 42 e tabela 3).

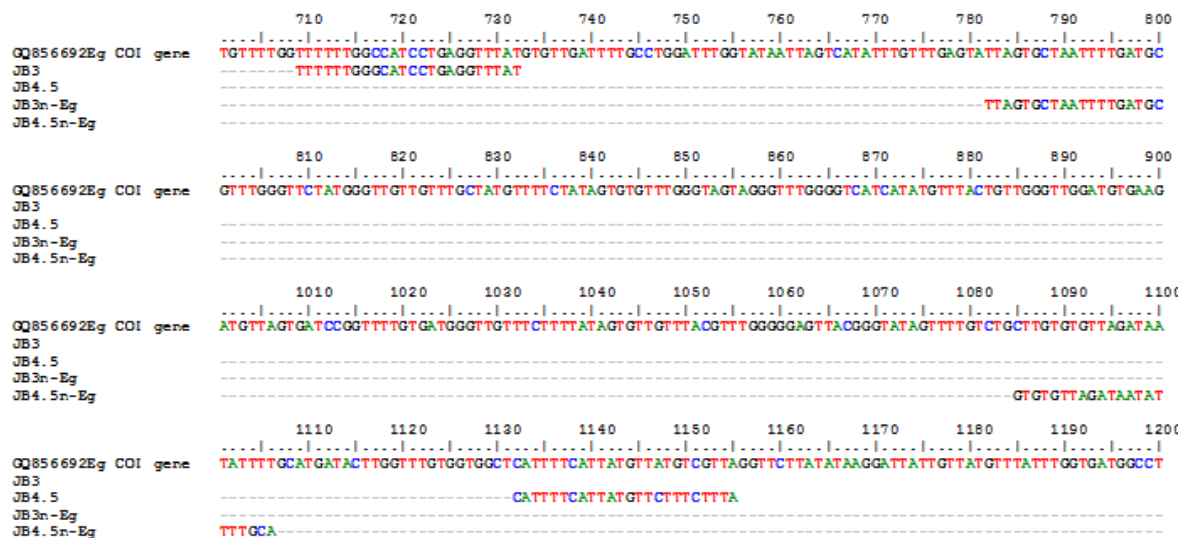


Figura 40: “Primers” externos (JB3/JB4.5) e “Primers” internos (JB3n-Eg/JB4.5n-Eg) alinhados com a sequência do gene COI de *E. granulosus*.

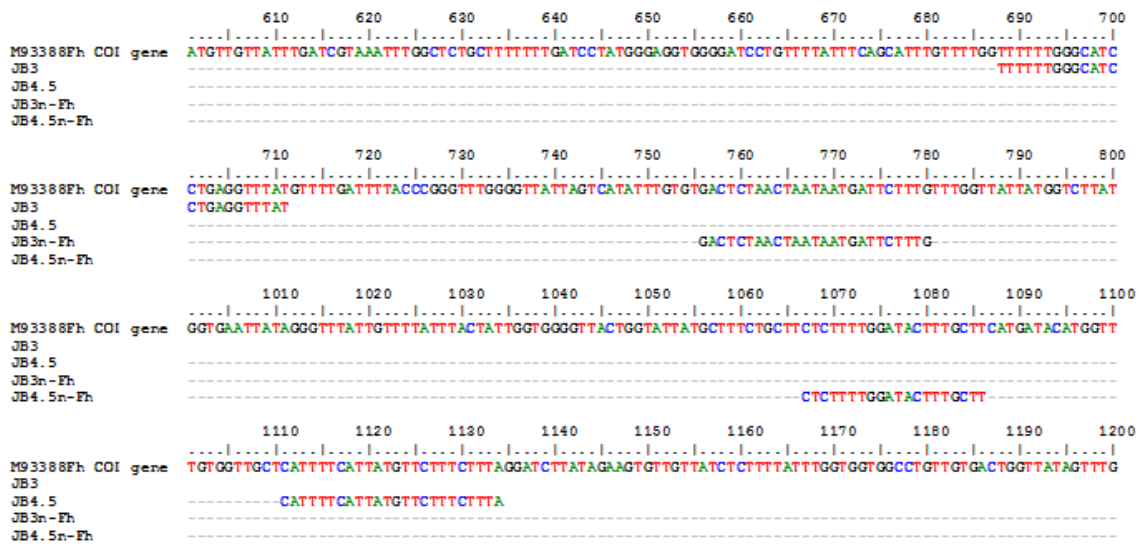


Figura 41: “Primers” externos (JB3/JB4.5) e “Primers” internos (JB3n-Fh/JB4.5n-Fh) alinhados com a sequência do gene COI de *F. hepatica*.

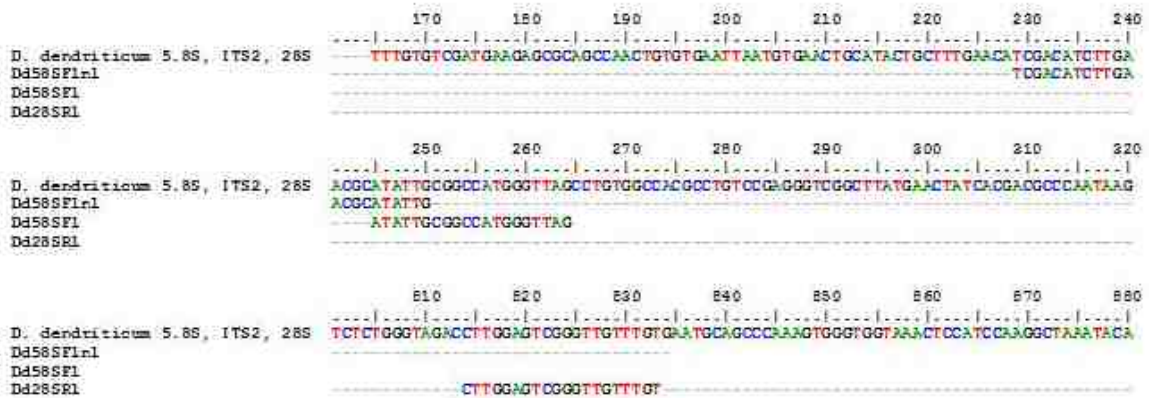


Figura 42: “Primers” externos (Dd58SF1/Dd28RF1) e primer interno (Dd58SF1n1) alinhados com a sequenciadas regiões 5.8S, ITS2 e 28S de *D. dendriticum*.

Tabela 3 – Identificação dos “Primers”, sequências, região alvo e tamanho do fragmento amplificado

Nome	Sequência (5′- 3′)	Região	Tamanho do fragmento (pb)
JB3n-Eg	TTAGTCCTAATTTTGATGCG	COI	300
JB4.5n-Eg	TGCAAAATATTATCTAACACAC	COI	300
JB3n-Fh	GACTCTAACTAATAATGATTCTTTG	COI	300
JB4.5n-Fh	AAGCAAAGTATCCAAAAGAG	COI	300
Dd58SF1n1	ATCGACATCTTGAACGCATATTG	ITS2	600

pb: Pares de bases

4.1 – Otimização de PCR com “Primers” internos

4.1.1 – Amplificação do gene mitocondrial COI com os “Primers” JB3n-Eg/JB4.5n-Eg

Inicialmente foi testada a capacidade destes “Primers” amplificarem o referido fragmento, com uma temperatura de *annealing* de 50°C, a partir de DNA de *E. granulosus*, e diluições sucessivas de DNA de *E. granulosus* em água destilada (1:10; 1:100 e 1:1000), de DNA dos outros parasitas estudados e DNA do hospedeiro (ovino e bovino). Não houve amplificação (Figura 43). Foi também testada a capacidade destes “Primers” amplificarem os produtos amplificados, de *E. granulosus*, em reações anteriores (com os “Primers” JB3/JB4.5), com temperaturas de *annealing* de 45, 50 e 55°C. Não se registando também nenhuma amplificação (Figura 44).



Figura 43: Resultados de PCR com “Primers” JB3n-Eg/JB4.5n-Eg que amplificam um fragmento de aproximadamente 300pb do gene mitocondrial COI. 1- *E. granulosus*; 2- *E. granulosus* (1:10); 3- *E. granulosus* (1:100); 4- *E. granulosus* (1:1000); 5- *F. hepatica*; 6- *D. dendriticum*; 7- Ovino; 8- Bovino; CN- Controlo negativo. M: Marcador.

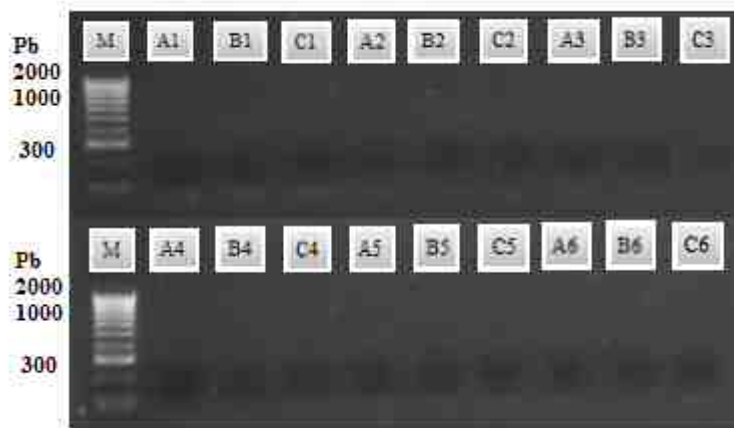


Figura 44: Resultados de PCR com “Primers” JB3n-Eg/JB4.5n-Eg que amplificam um fragmento de aproximadamente 300pb do gene mitocondrial COI. 1- Produto de amplificação de *E. granulosus*; 2- Produto de amplificação de *E. granulosus* (1:10); 3- Controlo positivo da 1ª reação; 4- Controlo positivo da 2ª reação; 5- Controlo negativo da 1ª reação e 6- Controlo negativo da 2ª reação. A:45°C; B:50°C; C:55°C. M: Marcador.

4.1.2 – Amplificação do gene mitocondrial COI com os “Primers” JB3n-Fh/JB4.5n-Fh

Foi testada a capacidade destes “Primers” amplificarem o referido fragmento, com uma temperatura de *annealing* de 50°C, a partir de DNA de *F. hepatica*, diluições sucessivas de DNA de *F. hepatica* em água destilada (1:10; 1:100 e 1:1000), de DNA dos outros parasitas estudados e DNA do hospedeiro (ovino e bovino). Não tendo existido nenhuma amplificação (Figura 45). Foi também testada a capacidade destes “Primers” amplificarem os produtos amplificados, de *F. hepatica*, em reações anteriores (com os “Primers” JB3/JB4.5), com temperaturas de *annealing* de 45, 50 e 55°C. Conseguindo amplificar os produtos da primeira amplificação (com os “Primers” JB3/JB4.5) de DNA de *F. hepatica* a 45, 50 e 55°C, obtendo reações negativas nos controlos positivos (Figura 46).



Figura 45: Resultados de PCR com “Primers” JB3n-Fh/JB4.5n-Fh que amplificam um fragmento de aproximadamente 300pb do gene mitocondrial COI. 1- *F. hepatica*; 2- *F. hepatica* (1:10); 3- *F. hepatica* (1:100); 4- *F. hepatica* (1:1000); 5- *E. granulosus*; 6- *D. dendriticum*; 7- Ovino; 8- Bovino; CN- Controlo negativo. M: Marcador.

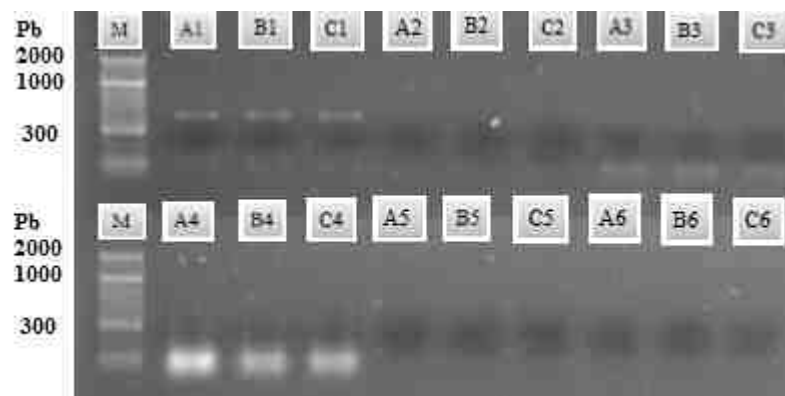


Figura 46: Resultados de PCR com “Primers” JB3n-Fh/JB4.5n-Fh que amplificam um fragmento de aproximadamente 300pb do gene mitocondrial COI. 1- Produto de amplificação de *F. hepatica*; 2- Produto de amplificação de *F. hepatica* (1:10); 3- Controlo positivo da 1ª reação; 4- Controlo positivo da 2ª reação; 5- Controlo negativo da 1ª reação e 6- Controlo negativo da 2ª reação. A:45°C; B:50°C; C:55°C. M: Marcador.

4.1.3 – Amplificação da região ribossomal ITS2 com os “Primers” Dd58SF1n1/Dd28SR1

Inicialmente foi testada a capacidade destes “Primers” amplificarem o referido fragmento, com uma temperatura de *annealing* de 60°C e 5% de DMSO, a partir de DNA de *D. dendriticum*, diluições sucessivas de DNA de *D. dendriticum* em água destilada (1:10; 1:100 e 1:1000), de DNA dos outros parasitas estudados e DNA do hospedeiro (ovino e bovino). Não se registando nenhuma amplificação (Figura 47). Foi também testada a capacidade destes “Primers” amplificarem os produtos amplificados em reações anteriores (com os “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1) a 3 temperaturas

diferentes (50, 60 e 65°C) com 5%DMSO, não se registrando qualquer amplificação mais uma vez (Figura 48).

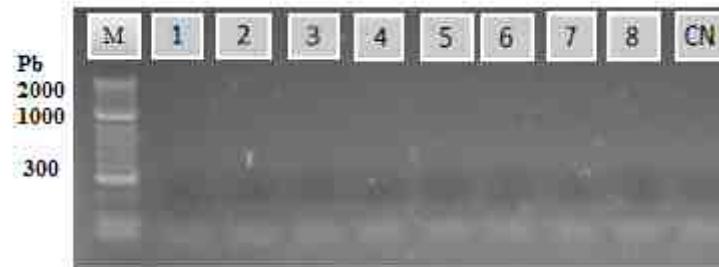


Figura 47: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1n1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2. 1- Produto de amplificação de *D. dendriticum*; 2- Produto de amplificação de *D. dendriticum* (1:10); 3- *D. dendriticum* (1:100); 4- *D. dendriticum* (1:1000); 5- *E. granulosus*; 6- *F. hepatica*; 7- Ovino; 8- Bovino; CN- Controlo negativo. M: Marcador.

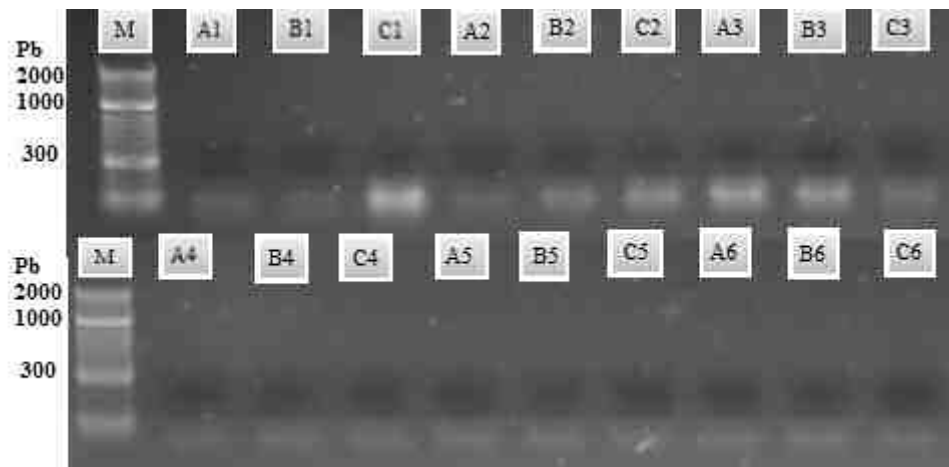


Figura 48: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1n1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2. 1- Produto de amplificação de *D. dendriticum*; 2- Produto de amplificação de *D. dendriticum* (1:10); 3- Controlo positivo da 1ª reação; 4- Controlo positivo da 2ª reação; 5- Controlo negativo da 1ª reação e 6- Controlo negativo da 2ª reação. A:55°C; B:60°C; C:65°C. M: Marcador.

5 – Sequenciação

Alguns produtos de amplificação de espécies diferentes têm tamanho semelhante. Portanto, para confirmar que se amplificou a região desejada, assim como para confirmar a identidade do exemplar de *F. hepatica* encontrado no matadouro de Pedrogão Grande e exemplares de *D. dendriticum* recolhidos noutra ocasião, sequenciaram-se esses produtos de amplificação por PCR (tabela 4):

Tabela 4 – Produtos de amplificação selecionados para sequenciação.

Amostra	Código	“Primers”	Região amplificada	Tamanho do fragmento (pb)
P1	Fasc1	JB3/JB4.5	COI	460
P7	Fasc2	JB3/JB4.5	COI	460
FhPg1*	Fasc3	BD1/4S	ITS1	400
FhPg1*	Fasc4	Dd58SF1/Dd28RF1	ITS2	600
Dicro1	Dicro1	Dd58SF1/Dd28RF1	ITS2	600
Dicro2	Dicro2	Dd58SF1/Dd28RF1	ITS2	600
L8	Eg1	JB3/JB4.5	COI	460

Nota: * - Exemplar de *F. hepatica* obtida no matadouro de Pedrogão Grande durante a recolha de amostras deste trabalho. Legenda: pb - Pares de bases. Fasc - *F. hepatica*; Dicro - *D. dendriticum*; Eg - *Echinococcus granulosus*.

As amostras P1 e P7 são de DNA de *F. hepatica*, de um projeto realizado anteriormente na Unidade de Helminologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical com o título “Produção e caracterização de antigénios de *F. gigantica* e sua avaliação no imunodiagnóstico de fasciolose – Tese de mestrado em parasitologia médica” (Almeida, A. 2011), e foram usadas neste trabalho como controlos positivos nas reações de PCR. A amostra FhPg1 é o exemplar de *F. hepatica* obtida durante a recolha de amostras no matadouro de Pedrogão Grande. Os exemplares de *D. dendriticum* estudados foram cedidos pela Unidade de Helminologia do Instituto de Higiene e Medicina tropical e provinham de um estudo ali realizado. O DNA de *E. granulosus* estudado neste projeto provinha de um projeto de Doutoramento em Parasitologia médica, a decorrer no

Instituto de Higiene e Medicina Tropical. As amostras de *D. dendriticum* e de *E. granulosus* haviam também sido usados como controlos positivos nas reações de PCR.

5.1 – Análise das sequências obtidas:

Após a análise das sequências obtidas com os “Primers” JB3/JB4.5 para o gene COI em relação a amostra Fasc1 obteve-se uma sequência consenso de aproximadamente 380 pb e para da amostra Fasc2 obteve-se uma sequência consenso de aproximadamente 450pb. Para o exemplar de *F. hepatica* encontrado no matadouro de Pedrogão Grande, a sequência consenso foi de aproximadamente 500pb para a região ITS1 (amplificada com os “Primers” BD1/4S - Fasc3) e a sequência consenso da amostra de aproximadamente 620pb para região ITS2 (amplificada com os “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 - Fasc4).

A sequência consenso dos fragmentos amplificados com os “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 para a região ITS2 dos dois exemplares de *D. dendriticum* foi de aproximadamente 430pb para a amostra Dicro1. As sequências de Dicro2 não foram de qualidade suficiente, tendo-se conseguido apenas sequências de cerca de 60pb.

Após análise das sequências obtidas com os “Primers” JB3/JB4.5 para o gene mitocondrial COI da amostra de Eg1 obteve-se uma sequência consenso de aproximadamente 370pb.

6 – Análise filogenética

As sequências obtidas (Fasc1, Fasc2, Fasc3, Fasc4, Dicro1 e Eg1) foram usadas individualmente para pesquisar outras sequências semelhantes e disponíveis em bases de dados através de “BLAST”. As sequências pertencentes à mesma espécie ou género foram usadas, assim como dos géneros mais próximos (sequência externa ou *outgroup*), para análise filogenética com as sequências obtidas neste trabalho. As sequências foram alinhadas e editadas manualmente através do programa Bioedit, retirando regiões com inserções ou deleções em que o alinhamento não era robusto, e reduzindo o número de amostras a sequências únicas.

6.1 – Análise filogenética de Fasc1

Após pesquisa de BLAST com a amostra Fasc1, para o gene COI, obtiveram-se 34 sequências de *F. hepatica* e 14 de *F. gigantica*, assim como 1 de *Paragonimus spp.* e 1 de *Fascioloides magna*, sendo os dois últimos utilizados como grupo externo. O alinhamento situa-se entre as posições 685 e 1067 do gene e detetaram-se 5 locais polimórficos de entre o género *Fasciola*.

A sequência da amostra Fasc1 era indistinguível de duas sequências obtidas de amostras do continente americano (Figuras 49 e 50). A rede filogenética obtida através de SplitsTree4, usando distâncias obtidas através do parâmetro Kimura-2 e o algoritmo de NeighborNet, sugere que Fasc1 está mais próxima de outras amostras europeias e asiáticas do que de amostras africanas (Figura 50).

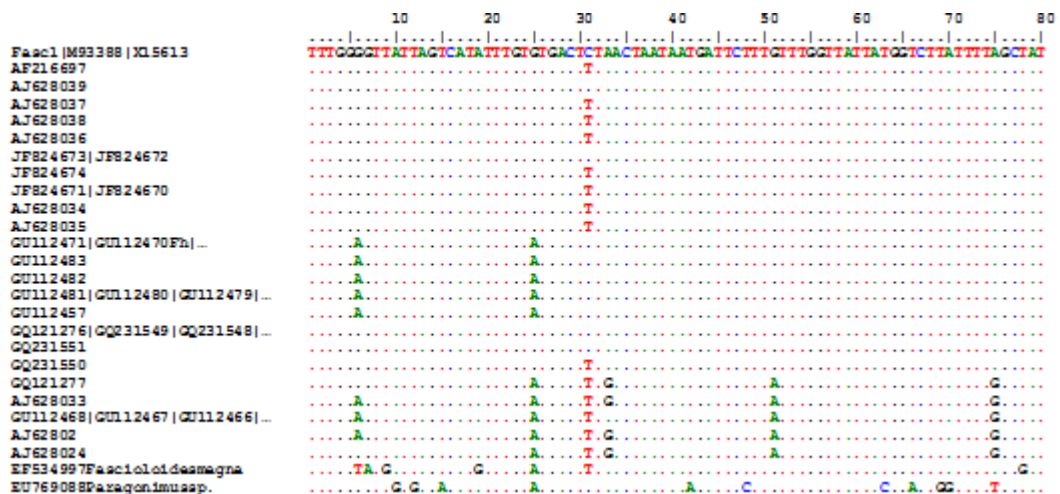


Figura 49A: Alinhamento de Fasc1 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna* e *Paragonimus spp.*).

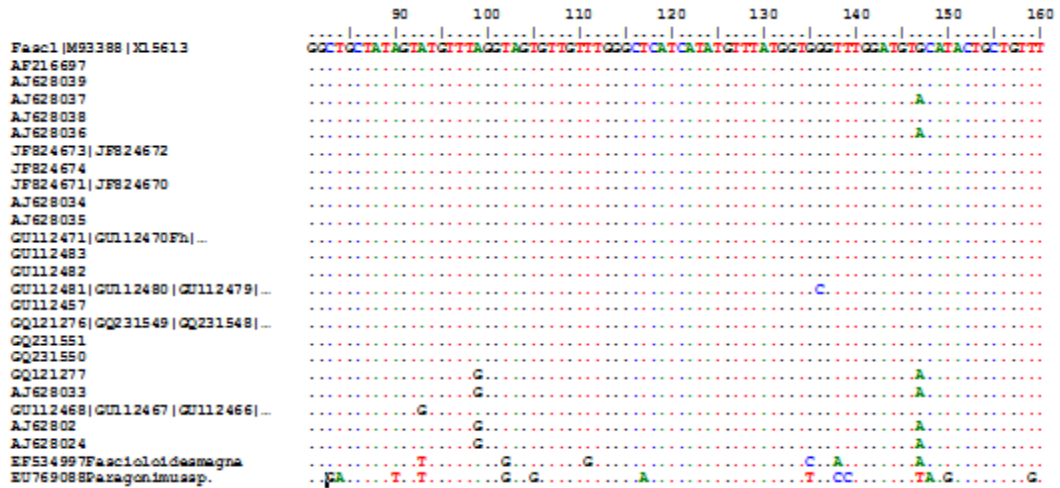


Figura 49B: Alinhamento de Fasc1 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna* e *Paragonimus spp.*).

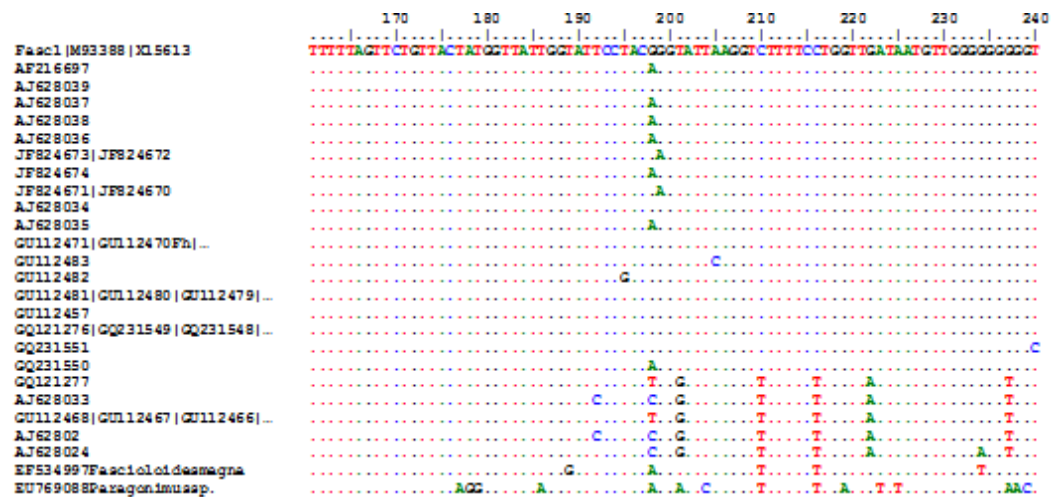


Figura 49C: Alinhamento de Fasc1 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna* e *Paragonimus spp.*).

6.2 – Análise filogenética de Fasc2

Após pesquisa de BLAST com a amostra Fasc2, para o gene COI, obtiveram-se 36 sequências de *F. hepatica* e 7 de *F. gigantica*, assim como 2 de *Echinostoma caproni* e 1 de *Echinostoma trivolis*, sendo os dois últimos utilizados como grupo externo. O alinhamento situa-se entre as posições 685 e 1135 do gene e detetaram-se 9 locais polimórficos de entre o género *Fasciola*.

A sequência da amostra Fasc2 era indistinguível de duas sequências obtidas de amostras do continente americano (Figuras 51 e 52). A rede filogenética obtida através de SplitsTree4, usando distâncias obtidas através do parâmetro Kimura-2 e o algoritmo de NeighborNet, sugere que Fasc2 está mais próxima de outras amostras europeias e africanas do que amostras asiáticas (Figura 52).

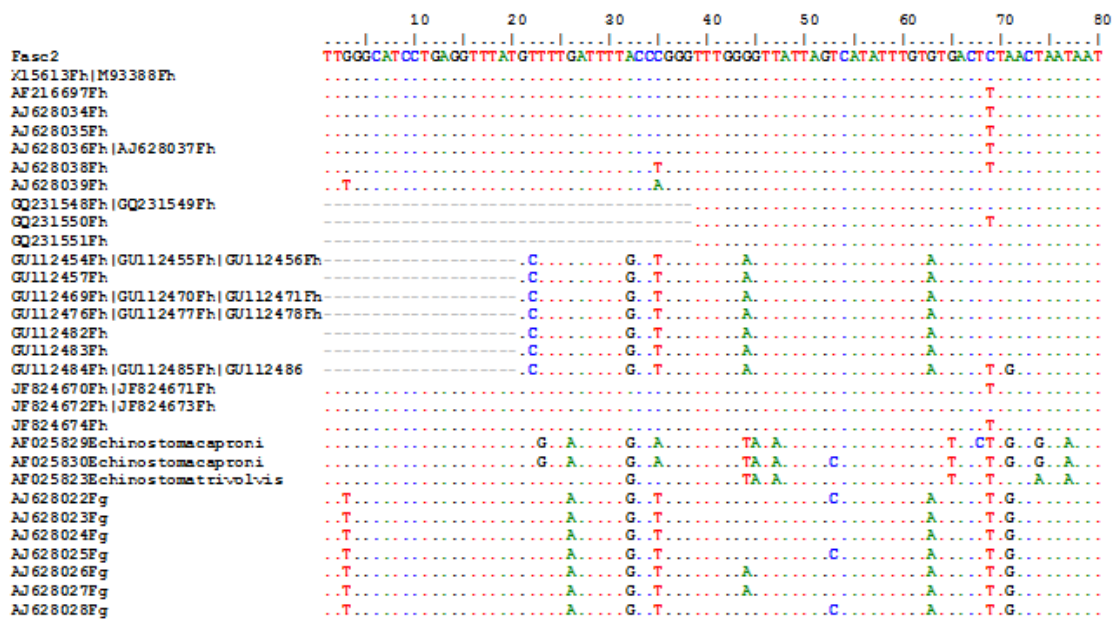


Figura 51A: Alinhamento de Fasc2 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Echinostoma caproni* e *Echinostoma trivolis*).

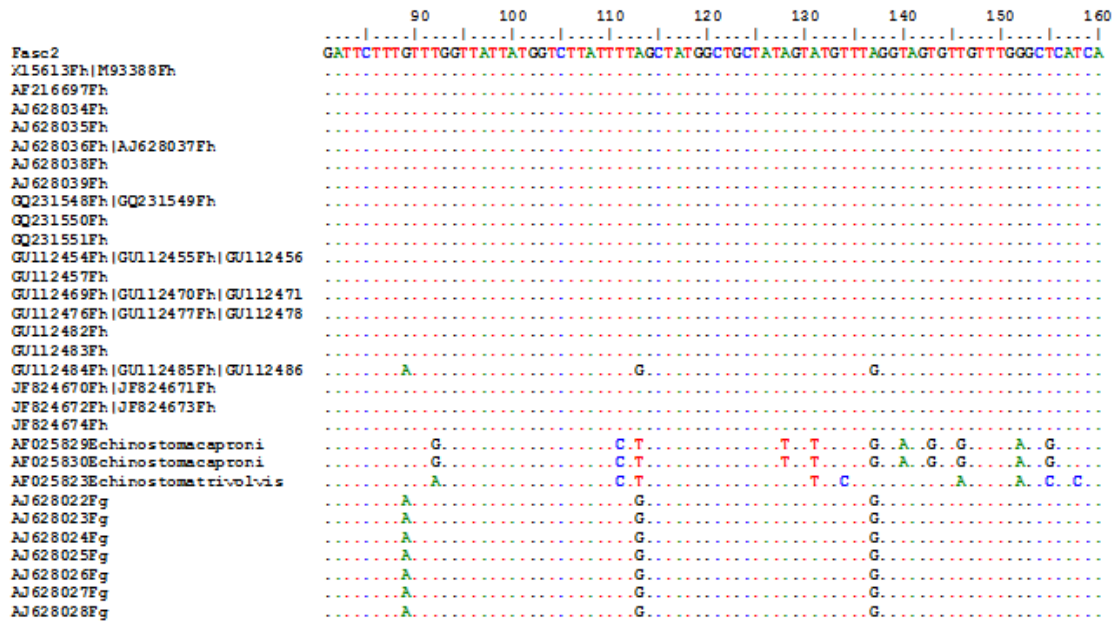


Figura 51B: Alinhamento de Fasc2 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Echinostoma caproni* e *Echinostoma trivolis*).

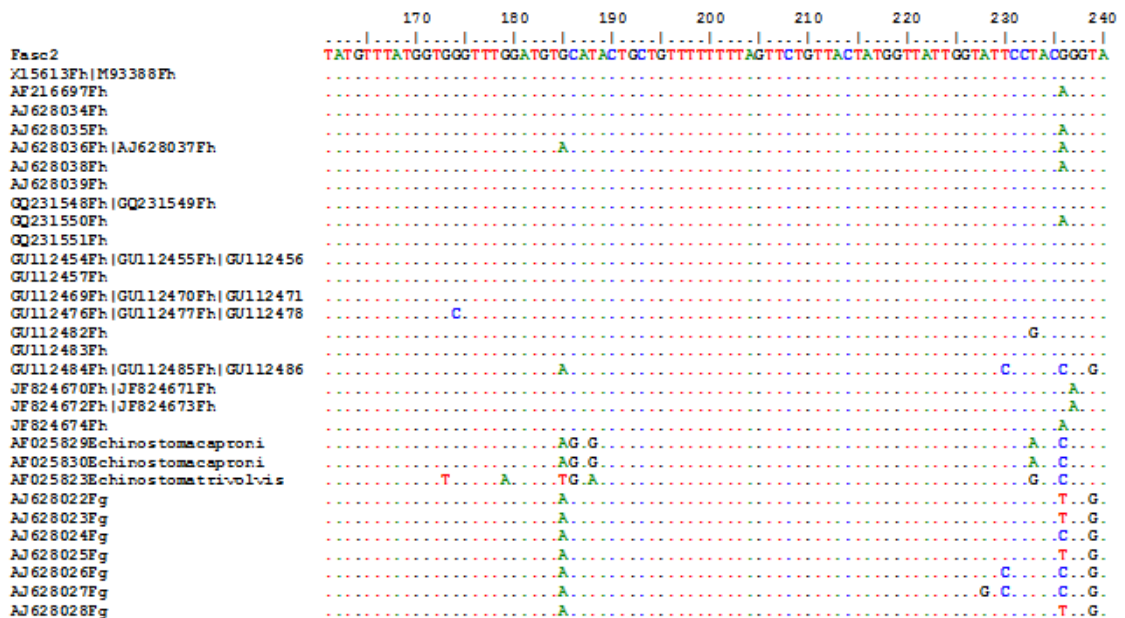


Figura 51C: Alinhamento de Fasc2 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Echinostoma caproni* e *Echinostoma trivolis*).

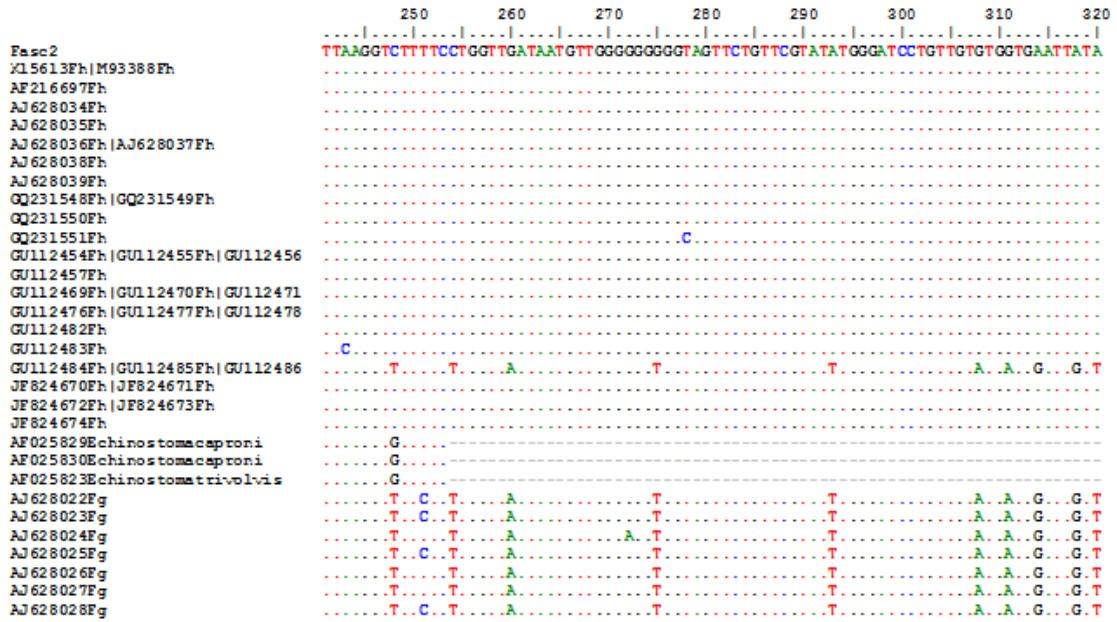


Figura 51D: Alinhamento de Fasc2 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Echinostoma caproni* e *Echinostoma trivolvis*).

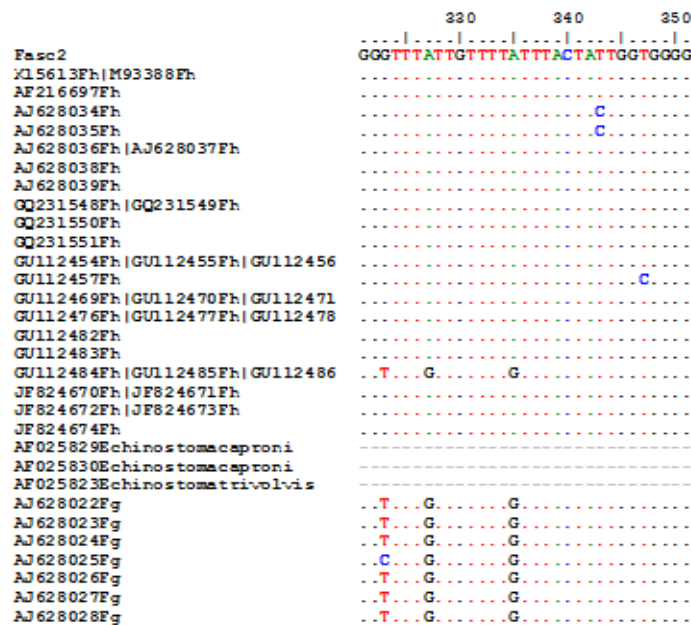


Figura 51E: Alinhamento de Fasc2 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Echinostoma caproni* e *Echinostoma trivolvis*).

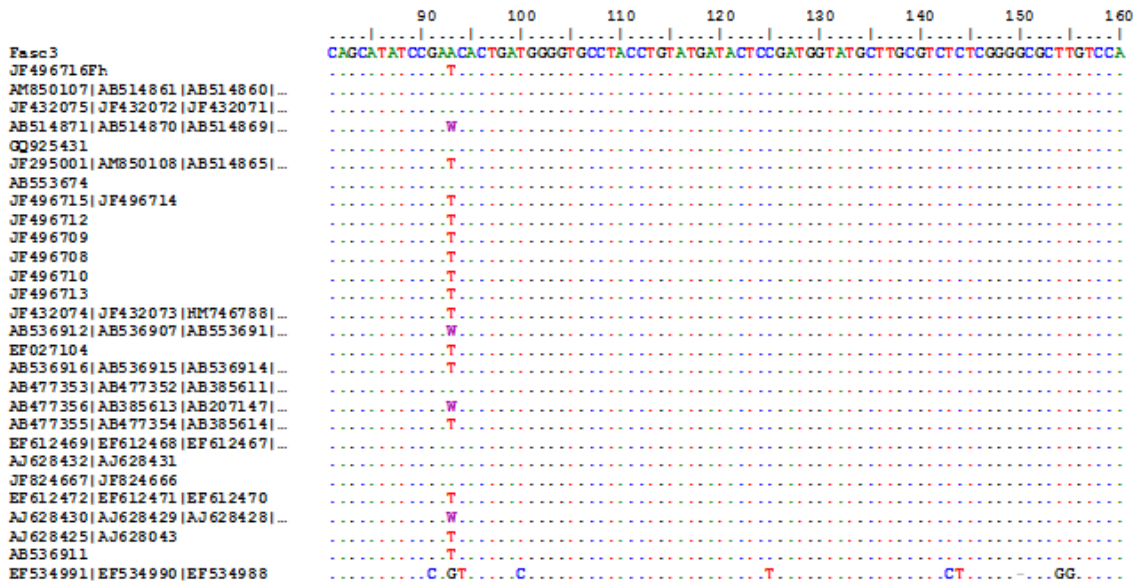


Figura 53B: Alinhamento de Fasc3 com todas as obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna*).

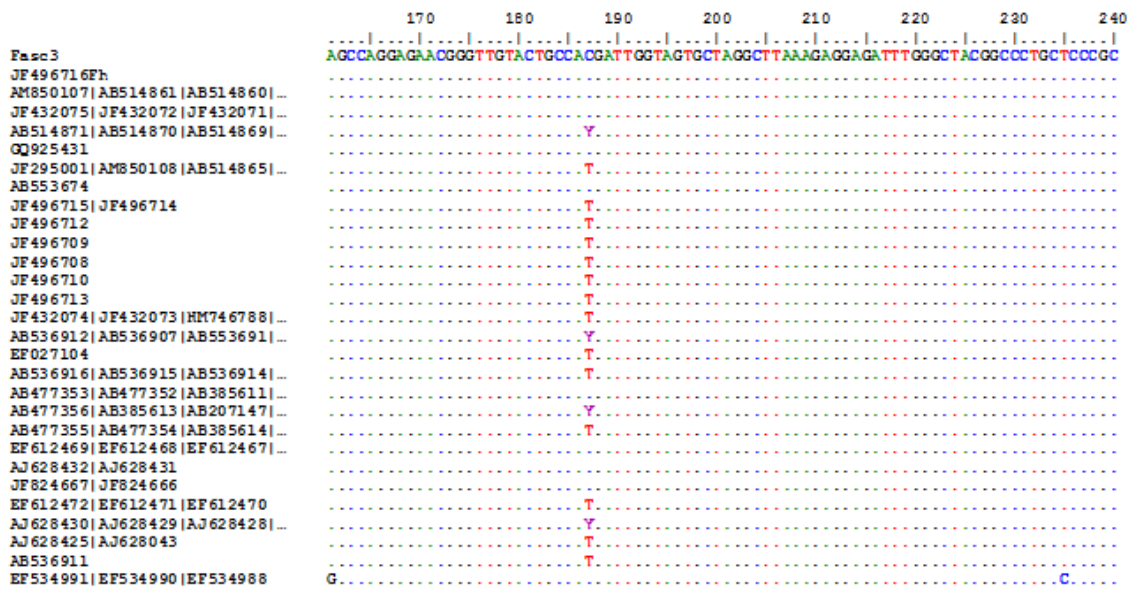


Figura 53C: Alinhamento de Fasc3 com todas as obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna*).

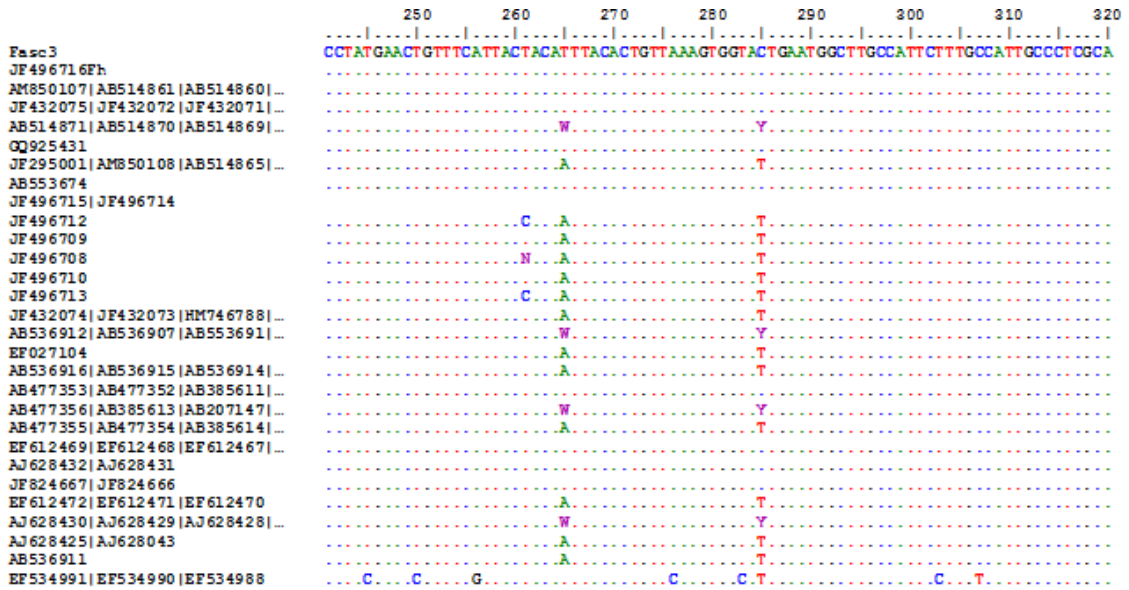


Figura 53D: Alinhamento de Fasc3 com todas as obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna*).

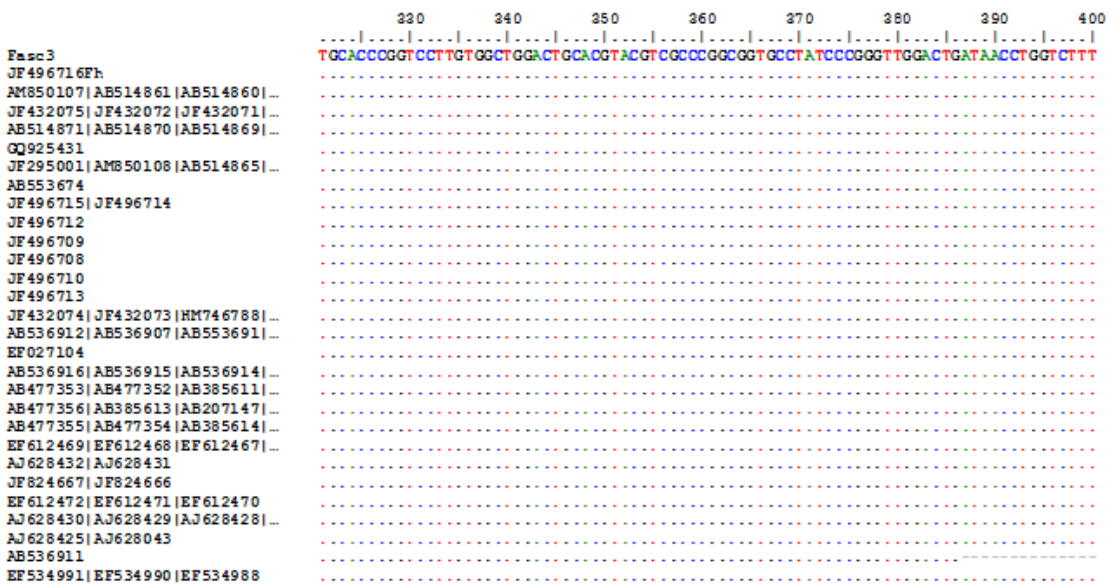


Figura 53E: Alinhamento de Fasc3 com todas as obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna*).

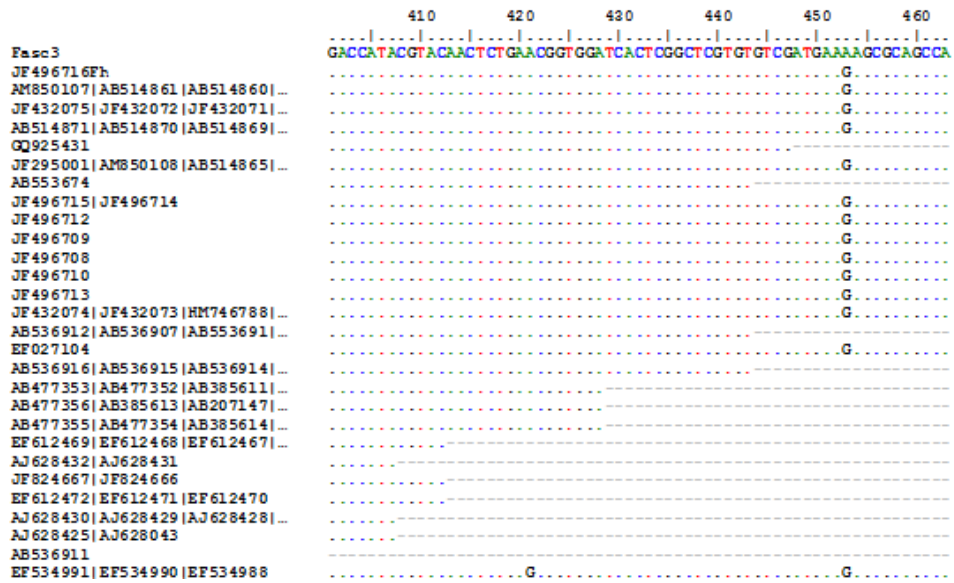


Figura 53F: Alinhamento de Fasc3 com todas as obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna*).

6.4 – Análise filogenética de Fasc4

Após pesquisa de BLAST com a amostra Fasc4, para a região ITS2, obteve-se um total de 97 sequências, das quais, 53 de *F. hepatica*, 25 de *F. gigantica*, 19 de *Fasciola spp.* (não estando diferenciadas em *F. hepatica* ou *F. gigantica*), assim como 3 sequências de *Fascioloides magna*, que foram utilizadas como grupo externo. O alinhamento situa-se entre as posições 23 e 347 da região ITS2 e detetaram-se 2 locais polimórficos de entre o género *Fasciola*.

A sequência da amostra Fasc4 era diferente de todas as sequências obtidas (Figuras 55 e 56). A rede filogenética obtida através de SplitsTree4, usando distâncias obtidas através do parâmetro Kimura-2 e o algoritmo de NeighborNet, mostra que Fasc4 as duas sequências mais próximas são africanas e americanas (Figura 56).

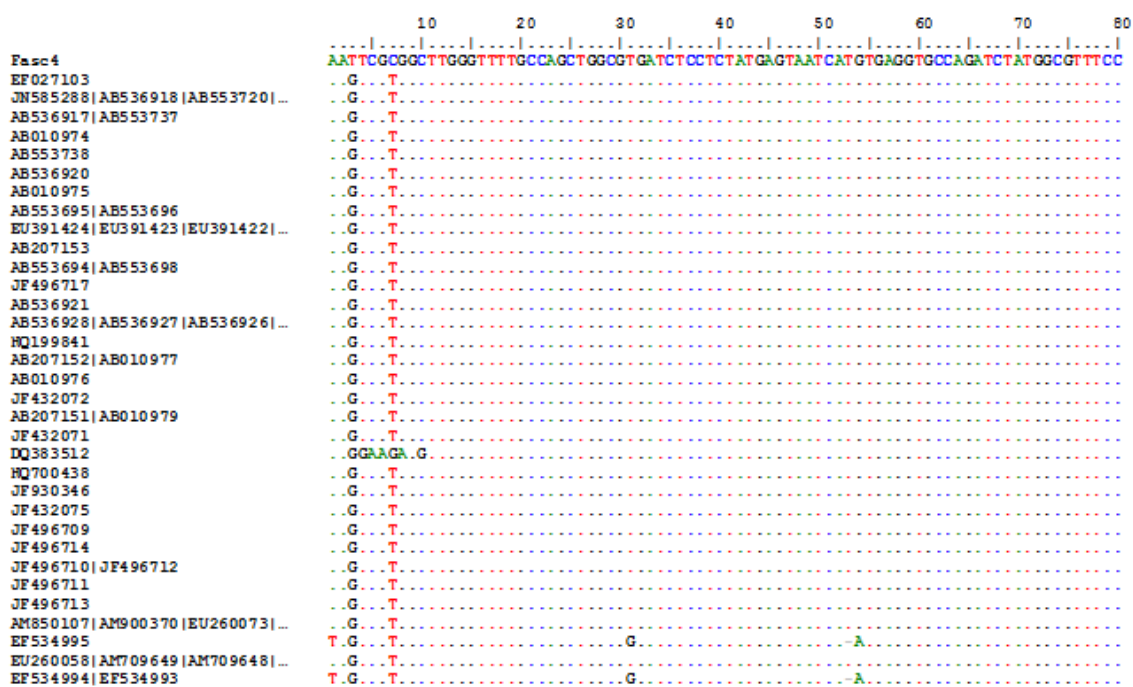


Figura 55A: Alinhamento de Fasc4 com todas as sequências obtidas através da pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna*).

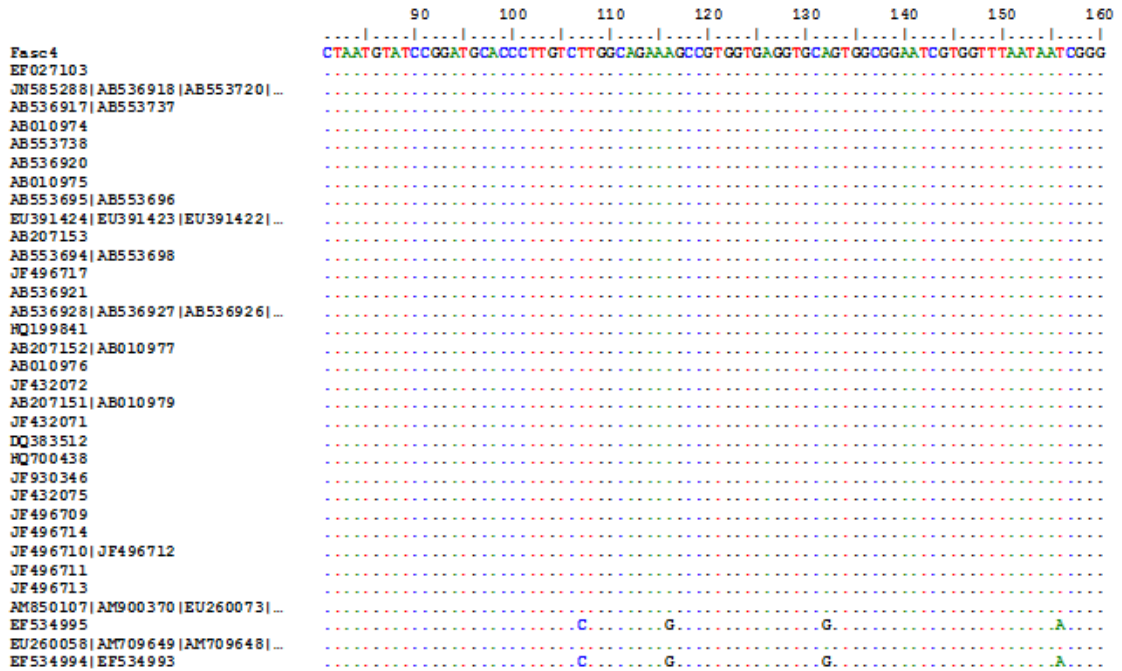


Figura 55B: Alinhamento de Fasc4 com todas as seqüências obtidas através da pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna*).

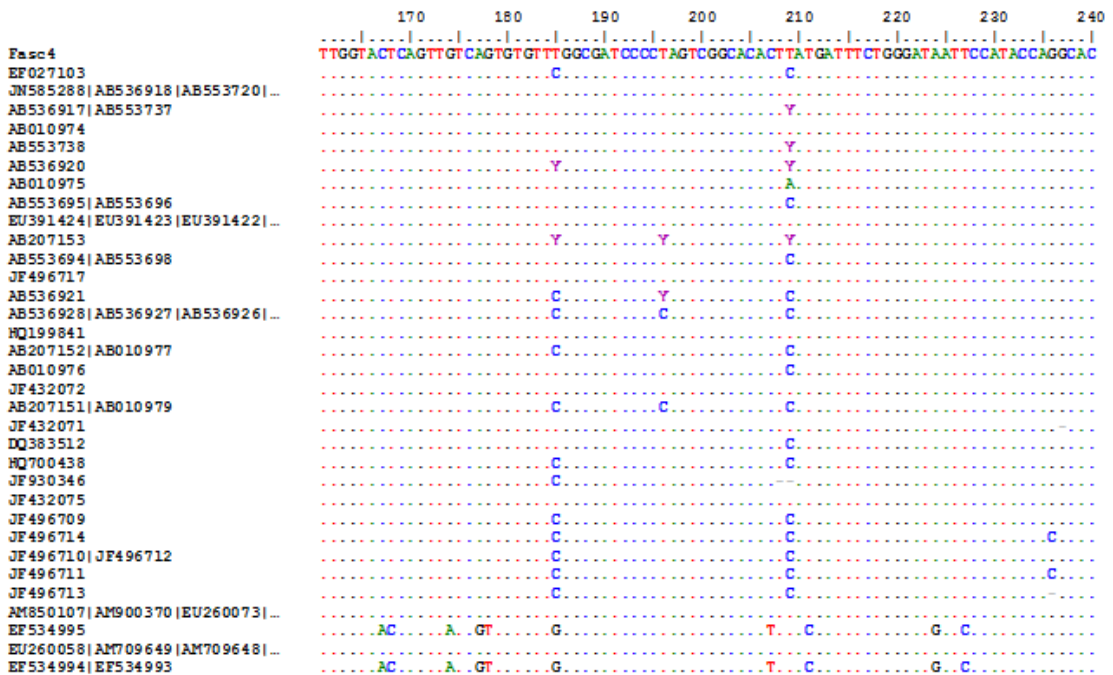


Figura 55C: Alinhamento de Fasc4 com todas as seqüências obtidas através da pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*Fascioloides magna*).

6.5 – Análise filogenética de Dicro1

Após pesquisa de BLAST com a amostra Dicro1, para a região ITS2, obteve-se um total de 19 sequências, das quais, 2 de *D. dendriticum*, uma de *D. orientalis*, 2 de *D. hospes*, 4 do género *Alloglossidium* e 10 do género *Aptorchis*, servindo as espécies destes dois géneros como grupo externo. Como não se encontrou uma sequência completa para esta região em *D. dendriticum*, determinou-se que em relação a *Telorchis bonnerensis*, um trematode filogeneticamente próximo do *D. dendriticum*, a região do alinhamento se situa entre a posição 130 da região 5.8S e a posição 192 da região 28S (flanqueiam a região ITS2) e detetaram-se 83 locais polimórficos.

A sequência da amostra Dicro1 era indistinguível das duas sequências de *D. dendriticum*, ambas provenientes do continente Asiático (Figuras 57 e 58). A rede filogenética obtida através de SplitsTree4, usando distâncias obtidas através do parâmetro Kimura-2 e o algoritmo de NeighborNet, sugere que Dicro1 está também, próxima de sequências das outras espécies do género *Dicrocoelium* (Figura 58).

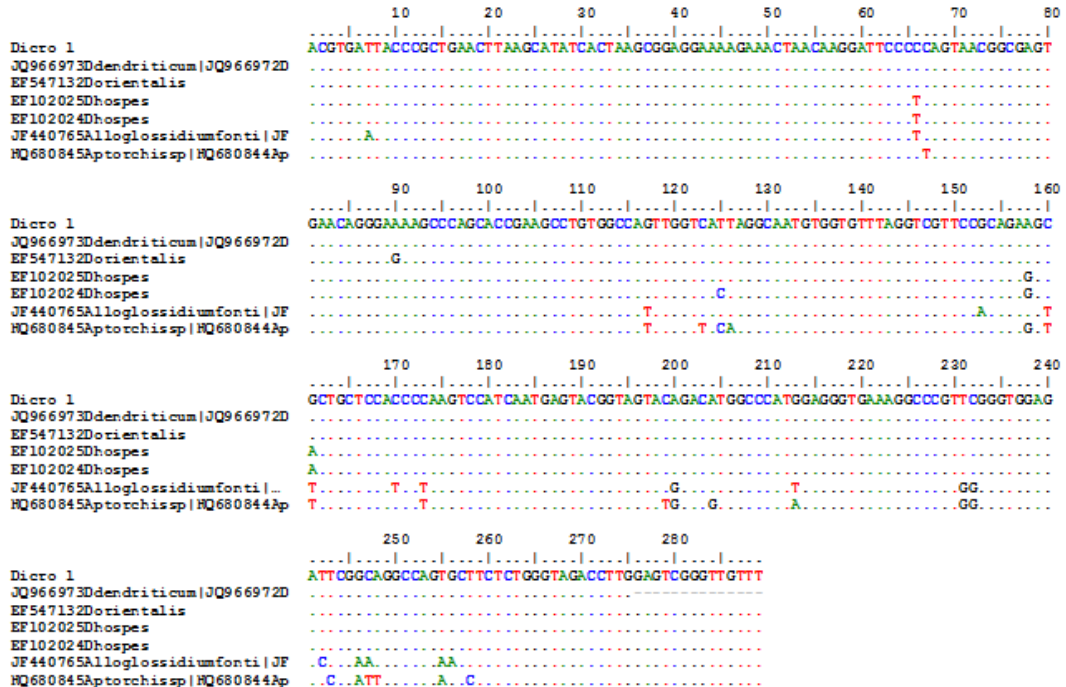


Figura 57: Alinhamento de Dicro1 com todas as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (espécies do género *Alloglossidium* e do género *Aptorchis*).

6.6 – Análise filogenética de Eg1

Após pesquisa de BLAST com a amostra Eg1, para o gene COI, obteve-se um total de 77 sequências de *E. granulosus* e uma de *T. hydatigena*, sendo esta utilizada como grupo externo. O alinhamento situa-se entre as posições 708 e 1082 do gene e detetaram-se 2 locais polimórficos de entre o género *Echinococcus*.

A sequência da amostra Eg1 era indistinguível de 4 sequências obtidas no continente Europeu, mais precisamente duas da Turquia e duas de Portugal (Figuras 59 e 60). A rede filogenética obtida através de SplitsTree4, usando distâncias obtidas através do parâmetro Kimura-2 e o algoritmo de NeighborNet, sugere que Eg1 faz parte de um grupo homogêneo europeu (Figura 60).

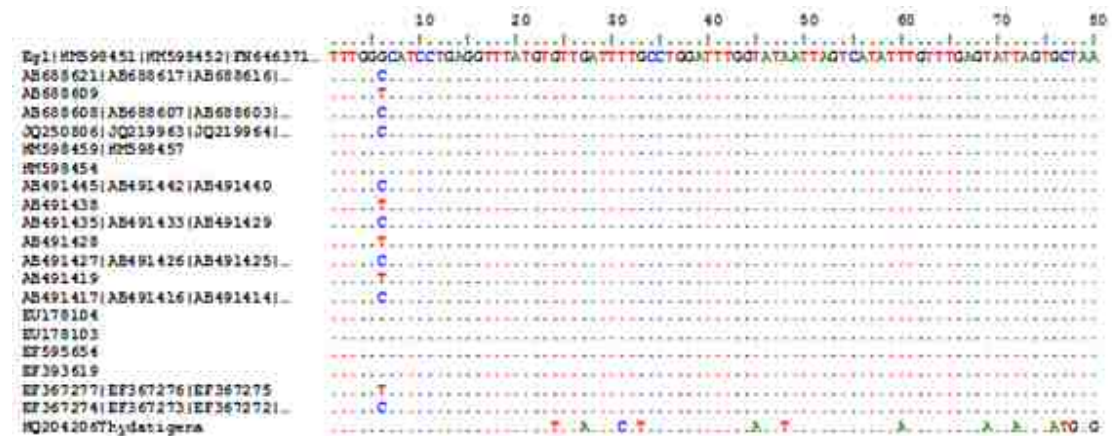


Figura 59A: Alinhamento de Eg1 com todas as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*T. hydatigena*).

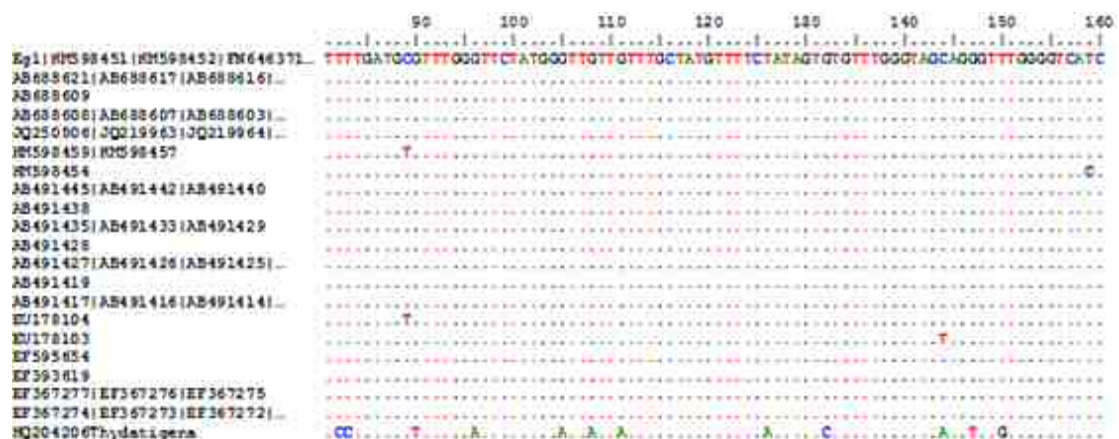


Figura 59B: Alinhamento de Eg1 com todas as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*T. hydatigena*).

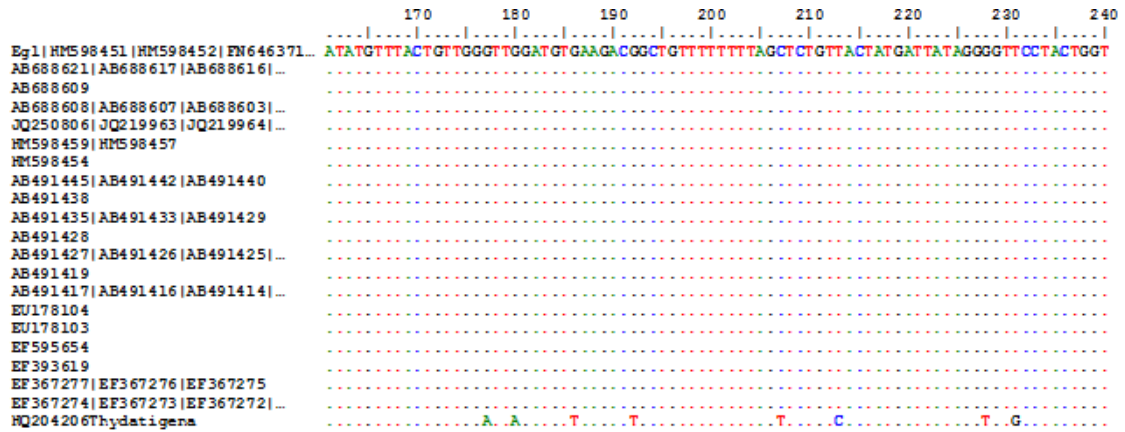


Figura 59C: Alinhamento de Egl com todas as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*T. hydatigena*).

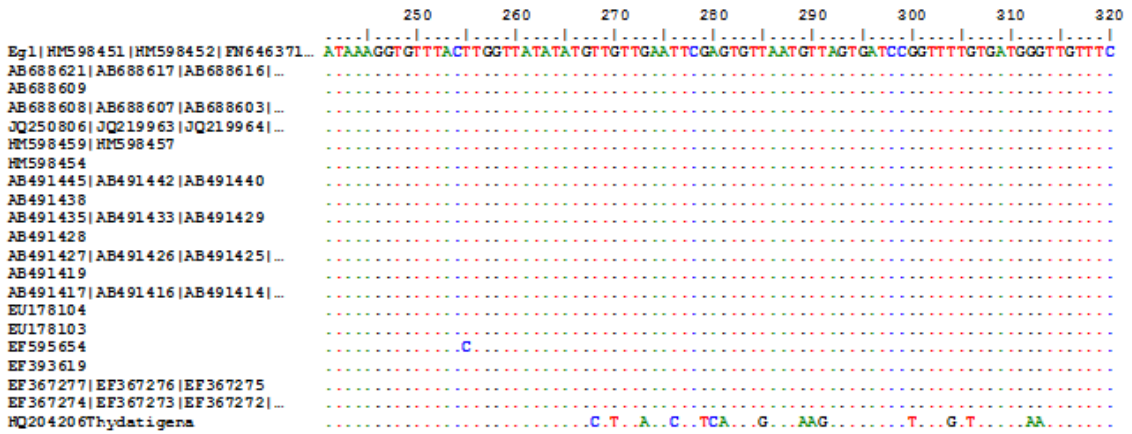


Figura 59D: Alinhamento de Egl com todas as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*T. hydatigena*).

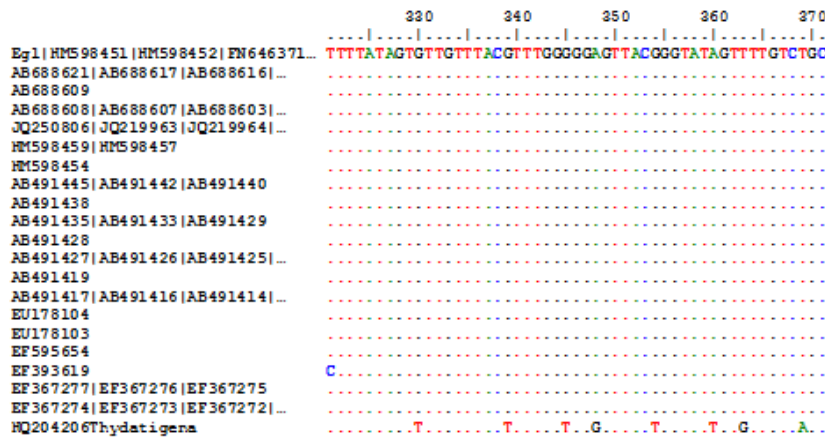


Figura 59E: Alinhamento de Egl com todas as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo (*T. hydatigena*).

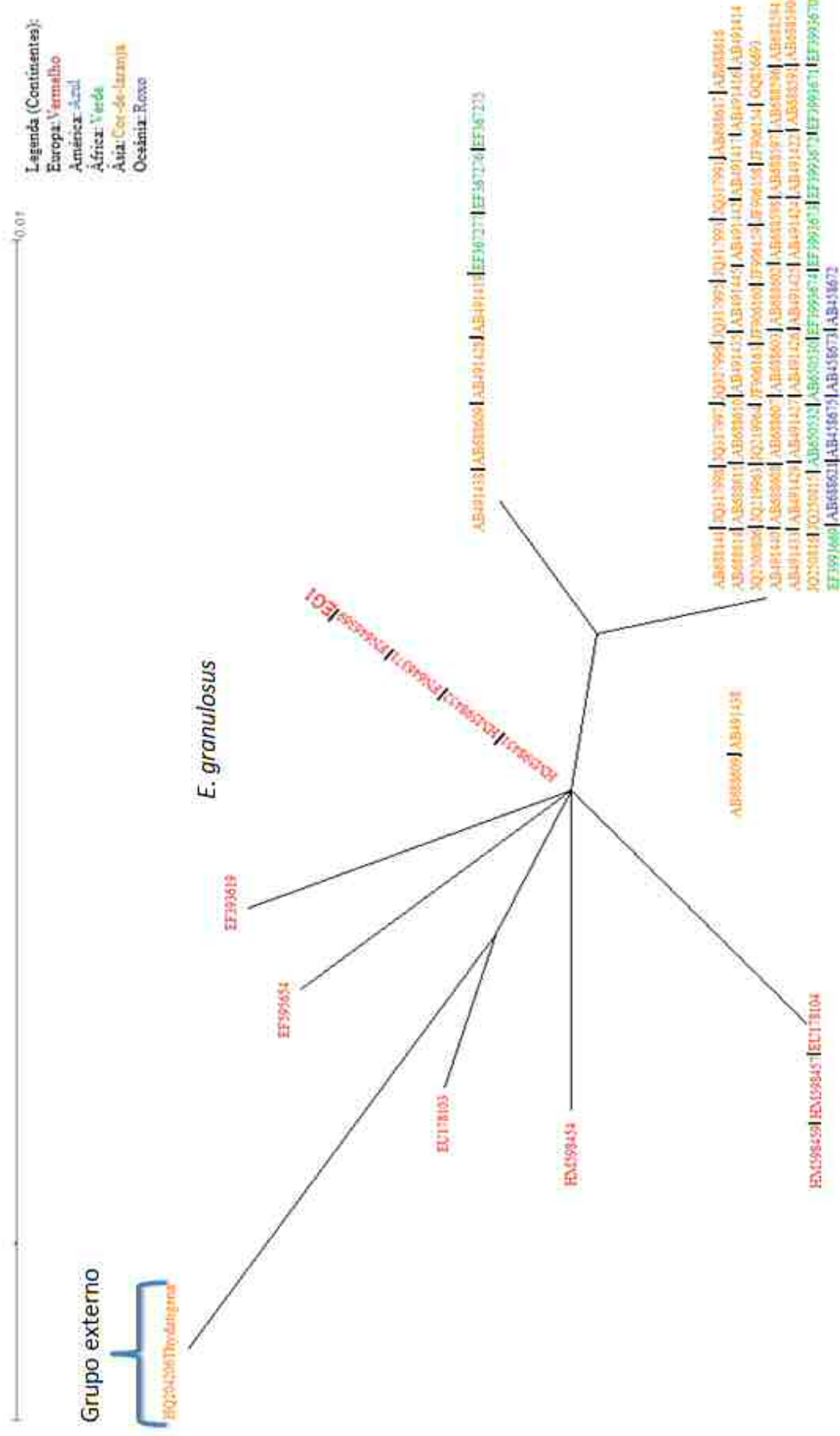


Figura 60: rede filogenética de Egl1 gerada com o programa “SplitsTree” usando distâncias de Kimura-2-Parameter em Neighbor-Net.

7 – Análise de prevalência

Através da análise molecular, tal como na inspeção visual (com exceção de um caso), não foi possível detetar nenhuma amostra que estivesse parasitada com algum dos helmintas pesquisados neste estudo, apesar dos controlos positivos aquando dos testes terem sido também positivos. Contudo aquando da recolha de amostras foi detetado um exemplar de *F. hepatica* no interior do fígado de um bovino, como tal a prevalência deste estudo foi de 1%, com um intervalo de confiança de 0 a 5% (método de Jeffreys) para um nível de confiança de 0.95. Para *E. granulosus* e *D. dendriticum*, em que não se detetou nenhum animal parasitado, a prevalência é de 0%, com um intervalo de confiança de 0 a 2% (método de Jeffreys) para um nível de confiança de 0.95.

Capítulo V – Discussão

Capítulo V – Discussão

1 – Recolha de amostras

Em Portugal a inspeção sanitária de ovinos e bovinos para as parasitoses causadas por *E. granulosus*, *F. hepatica* e *D. dendriticum* passa essencialmente pelo exame visual (observação dos pontos de entrada dos parasitas no fígado) e algumas incisões realizadas para detetar a presença do mesmo. Muitas vezes, em casos de cargas parasitárias menores, ou incipientes, a presença dos parasitas não é detetada, o que leva a subestimar a prevalência destas parasitoses. Para além disso, os veterinários normalmente apenas registam a presença de parasitas caso os órgãos sejam rejeitados, e raramente indicam qual o parasita detetado. Segundo os inspetores sanitários a prevalência destas parasitoses atualmente está subestimada, e apenas o exame visual da carcaça não será suficiente para a deteção do parasita. Muitas vezes, no início da parasitose ou com uma menor carga parasitária o diagnóstico não é efetuado por falta de sinais de entrada do parasita ou devido ao facto de este não ter sido encontrado. Assim sendo, o exame macroscópico torna-se ineficaz na deteção destas parasitoses. Como tal seria bom desenvolver outras metodologias que auxiliassem o inspetor sanitário aquando da avaliação e análise da carcaça, para que, no caso da existência da parasitose as vísceras do animal sejam consideradas como impróprias para consumo humano.

Neste trabalho o principal objetivo foi realizar um estudo preliminar para estimar a prevalência destas helmintoses, e a sua distribuição, em ovinos e bovinos abatidos em matadouros de Portugal.

Para tentar identificar animais em que a infeção não seja evidente a olho nu, usaram-se técnicas de deteção de DNA, que são sensíveis a baixas concentrações de DNA do parasita, avaliaram-se métodos publicados de amplificação por PCR de DNA destes parasitas, e tentou-se desenvolver métodos para aumentar a sensibilidade da deteção que ao mesmo tempo conseguissem efetuar o diagnóstico diferencial do(s) parasita(s) envolvido(s).

As amostras foram recolhidas em dois matadouros (Pedrogão Grande e Leiria), tendo sido obtida uma amostra total de 100 animais (50 ovinos e 50 bovinos), sendo que em cada matadouro foram recolhidas amostras de 25 ovinos e 25 bovinos. O processo

de recolha de amostras foi executado de forma aleatória, em que a cada 6 animais abatidos um foi selecionado para o estudo, tendo-se recolhido amostras de fígado e pulmão, para garantir maior homogeneidade do universo amostral. Segundo o anuário pecuário de 2008/2009 da Direção Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural, em 2008, existiam em Portugal cerca de 1 439 000 bovinos e 3 145 000 ovinos. Como se tratava de um estudo limitado por tempo e orçamento o número de animais estudados não foi o ideal, mas para uma prevalência estimada de 50% (como não existiam dados anteriores este valor foi assumido, de modo a determinar o valor mais alto correspondente ao número mínimo da amostra a obter) o número de amostras deveria ser de 385 bovinos e 385 ovinos, com uma margem de erro de 5% e um nível de confiança de 95%. Com o número de amostras recolhidas (50 ovinos e 50 bovinos), a margem de erro deste estudo será de 13,86%, o que foi considerado aceitável para um estudo preliminar. Estes cálculos foram efetuados com o calculador “Sample size calculator”.

Os animais selecionados para o estudo provinham de explorações sediadas nas regiões Centro, Lisboa e vale do Tejo e Alentejo. A maioria dos bovinos provinha da região de Lisboa e Vale do Tejo e Alentejo (88 %), e a maioria dos ovinos da região Centro e Alentejo (78 %). Este estudo poderá ser um bom indicador em termos epidemiológicos para esclarecer o estado destas parasitoses em bovinos na região do Alentejo, uma vez que a percentagem de bovinos estudados provenientes do Alentejo (36%) corresponde à percentagem de efetivo nacional naquela região. Não se registando qualquer semelhança entre a percentagem de animais obtidos de cada região neste estudo e a percentagem de animais existente em cada região de Portugal, de acordo com o anuário pecuário 2008/2009, como tal não seriam bons indicadores a nível nacional, mas, poderiam levantar questões epidemiológicas a nível regional que potenciassem futuros estudos. Uma amostragem em mais matadouros, durante um tempo mais alargado e com mais animais iria permitir uma amostragem mais representativa.

Este tipo de estudo baseado em animais abatidos em matadouros tem limitações, como por exemplo, o facto de os animais poderem não ter vivido a maior parte da sua vida nas explorações de origem, sendo muitos deles adquiridos pouco tempo antes do abate, a outras explorações. Para além disso, os animais que são levados para abate em matadouro geralmente são de explorações mais intensivas, onde há maior cuidado e

controlo em termos sanitários, não ocorrendo o mesmo em explorações mais pequenas e familiares. Este desequilíbrio da amostra confere uma limitação importante neste tipo de estudos pois é difícil de extrapolar a situação epidemiológica para explorações com pouca representatividade em matadouros, se bem que a sua importância em Portugal está a diminuir.

Idealmente, dever-se-ia proceder à recolha de amostras diretamente nas explorações (fezes para pesquisa de ovos e sangue para serologia) e conseguir o histórico dos animais abatidos, o que é virtualmente impossível. Seria também interessante alargar este estudo a todas as regiões, procedendo assim a um estudo epidemiológico a nível nacional para se avaliar o impacto destas parasitoses na saúde animal, pois os poucos dados que estão descritos na literatura nacional incidem em regiões limitadas, e remontam a 1998, no caso da Hidatidose animal, no distrito do Porto e Castelo Branco com uma incidência de 6,2 e 0,3, respetivamente (David de Moraes, 1998). No caso da fasciolose animal dados mais recentes apontam para uma prevalência de *F. hepatica* de aproximadamente 28%, entre os animais do Norte de Portugal e Noroeste de Espanha (Arias, *et al.*, 2011). No sul de Portugal, no conselho de Odemira, foi detetada uma prevalência de 3% através de técnicas serológicas (Cardozo, 2010). Para a Dicrocoeliose não se encontraram estudos publicados, como tal seria interessante avaliar a presença deste parasita. Contudo, as técnicas serológicas podem estar sujeitas a reações cruzadas, ou podem ser pouco sensíveis (Cengiz, *et al.*, 2010), pelo que se deve ter cuidado na sua utilização para estimar prevalências destes parasitas.

2 – Extração e quantificação de DNA

As concentrações de DNA total foram considerados como muito boas em termos de extração de DNA e com valores de pureza aceitáveis, contudo, futuramente seria importante proceder a novas lavagens das amostras que registaram valores mais baixos, ou seja, adicionar etanol absoluto (para o DNA precipitar) e remover o sobrenadante para retirar as impurezas e garantir que o grau de pureza se situe entre os valores ótimos. Por outro lado, a quantidade de sais na amostra estavam um pouco longe do valor considerado ótimo, pelo que se deverá precipitar novamente o DNA, proceder à lavagem da amostra e posteriormente a nova quantificação. Contudo, a maioria das

amostras foi amplificada por PCR quando esperado (ver abaixo) indicando que a qualidade do DNA era aceitável.

3 – Otimização da Técnica de PCR

3.1 – Amplificação do gene mitocondrial COI com os primers LCO1490/HCO2198

Foi feita otimização do PCR para amplificação de um fragmento (aproximadamente 700pb) do gene mitocondrial COI, com os primers LCO1490/HCO2198, que estão descritos como primers universais para 11 filos de invertebrados, incluindo *F. hepatica* (Folmer, *et al.*, 1994), que foi aqui usado como controlo positivo para o parasita. À melhor temperatura de *annealing* (50°C) não se conseguiu amplificar o DNA de quaisquer parasitas, apenas sendo amplificado o DNA dos hospedeiros (ovino e bovino). A análise de sequências presentes no GenBank confirmou que a amplificação de DNA de parasitas seria muito difícil com estes primers, dado o número elevado de diferenças na sequência no local de hibridização dos primers, principalmente na extremidade 3'. Mais especificamente, que estes primers tinham sido desenhados com base em sequências de bovinos. É possível que a amplificação de *F. hepatica* reportada na literatura tenha sido devida a contaminação, pois os produtos não foram sequenciados.

Assim, o controlo positivo utilizado nas reações seguintes foi o DNA do hospedeiro, servindo este PCR como um controlo de extração, ou seja, para garantir que o DNA extraído estava em condições de ser amplificado e que não havia inibição da reação. De entre as amostras de fígado de bovino, todas as pools foram positivas e nas amostras individuais apenas a amostra 50 e 81 (de entre 5 amostras testadas) ocorreu amplificação. Nas amostras de fígado de ovino apenas a pool 3 de ovino amplificou, tendo as restantes pools e 5 amostras individuais testadas sido negativas. De entre as amostras de pulmão, todas as amostras individuais e pools de ovino e bovino foram negativas, com exceção da amostra 65 de bovino. A melhor amplificação de amostras de bovino é consistente com o facto de os primers terem sido desenhados a partir de sequências desta espécie, sendo que, o facto de não ter ocorrido amplificação em

algumas amostras e pool pode dever-se ao facto de existir um excesso de sais nas amostras (o que inibe o PCR), como tal seria importante no futuro fazer uma segunda lavagem do DNA e nova amplificação, algo que não foi feito neste trabalho devido às limitações de tempo. Foi hipotetizado que algumas amostras ou pools não foram amplificadas devido à alta concentração de DNA, pelo que se testaram reações com menor concentração de DNA (diluições 1:10 e 100), contudo, estas reações foram negativas (inclusive o controlo positivo), mesmo após nova extração de DNA. Por essa razão suspeitou-se que existiu um problema com algum dos componentes da mix de PCR (por exemplo, degradação de primers, dNTPs, polimerase *Taq*). Infelizmente não houve tempo dentro do projeto para realizar os vários testes necessários para perceber qual seria o reagente que não estaria a funcionar corretamente, o que será feito futuramente.

3.2 – Amplificação do gene mitocondrial COI com os primers JB3/JB4.5

Escolheu-se o gene mitocondrial COI para deteção de parasitas por ter sido muito utilizado para a investigação da variação intra e interespecífica de trematodes e cestodes, utilizando para isso, por exemplo os primers JB3/JB4.5 (Bowles & McManus, 1993) que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb.

Após otimização para os reagentes e o termociclador utilizados, verificou-se que estes primers tinham a capacidade de amplificar o DNA de *F. hepatica* e de *E. granulosus* em diluições de até 1:10 (concentrações de 10,2 e 20,5ng/μL, respetivamente) não ocorrendo a amplificação de *D. dendriticum* nem de DNA do hospedeiro (ovino e bovino) e que a melhor temperatura de *annealing* para estas reações seria a 50°C.

Os testes de sensibilidade com DNA do hospedeiro revelaram também que seria possível detetar DNA de *F. hepatica* com o DNA do hospedeiro, em diluições até 1:100, estes testes também foram efetuados para *E. granulosus* e não se registou qualquer amplificação, nem mesmo o controlo positivo, isto poderá dever-se à deterioração das amostras e do controlo positivo, ou de algum dos reagentes da mix de PCR. Devido a este facto futuramente seria interessante proceder a nova extração de

DNA de *E. granulosus* e *F. hepatica* e realizar vários testes para perceber qual seria o reagente que não estaria a funcionar corretamente, para assim se reverter a situação e proceder ao teste de sensibilidade com DNA do hospedeiro. Futuramente seria também importante testar o DNA do parasita em diluições cada vez menores com DNA do hospedeiro (1:10, 1:100 e 1:1000). Isto para garantir que em quantidades mínimas de DNA do parasita em DNA do hospedeiro, este seria detetado e não haveria interferência do DNA do hospedeiro.

Não se registou qualquer amplificação em amostras de fígado de ovino e bovino (individuais e pools), tendo amplificado o controlo positivo, como tal pode-se concluir que não existia DNA dos parasitas nas concentrações mínimas detetáveis, através desta técnica.

3.3 - Amplificação da região ribossomal ITS1 com os primers BD1/4S:

A amplificação da região ITS1 de tremátodes e cestodes, incluindo do género *Echinococcus*, tem sido muito utilizada para a sua tipagem, muitas vezes seguido de RFLP. Os primers BD1/4S, que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1 (Bowles & McManus, 1993), são dos mais usados.

A otimização deste PCR requereu uma temperatura de *annealing* alta (60°C) e a adição de 5% de DMSO, que inibe a formação de estruturas secundárias no DNA, devido à presença de bandas inespecíficas.

Ao contrário do que foi reportado por Bowles & McManus (1993) não ocorreu a amplificação de DNA de *E. granulosus*, nem de *D. dendriticum* ou DNA dos hospedeiros (ovino e bovino) com este par de primers. Apenas se conseguiu amplificar DNA de *F. hepatica* e em diluições de até 1:100 (concentração de 1,02ng/μL), servindo de controlo positivo em reações futuras. Contudo, quando se testou o DNA de *F. hepatica* com DNA do hospedeiro não ocorreu amplificação, nem mesmo no controlo positivo, o mesmo acontecendo quando se processaram as amostras (individuais e pools). Como anteriormente, estes problemas de amplificação podem dever-se a deterioração do controlo positivo ou de algum dos reagentes da mix de PCR. Devido a este facto futuramente seria interessante proceder a nova extração de DNA de *F.*

hepatica e realizar vários testes aos reagentes para perceber qual seria o reagente que não estaria a funcionar corretamente.

Como para o PCR para COI, futuramente seria também importante testar o DNA do parasita em diluições cada vez menores com DNA do Hospedeiro (1:10, 1:100 e 1:1000). Isto para garantir que em quantidades mínimas de DNA do parasita em DNA do hospedeiro, este seria detetado.

3.4 - Amplificação da região ribossomal ITS2 com os primers Dd58SF1/Dd28SR1

Como não se previa que os primers usados nas reações de PCR anteriores amplificassem o género *Dicrocoelium*, estudou-se a região ITS2, que tem sido muito utilizada para o estudo genético e diferenciação molecular das diferentes espécies deste género. Escolheu-se os primers Dd58SF1/Dd28SR1 (Sharroks, A.D., 1994), que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb que inclui a região ITS2, e permite a diferenciação molecular entre *D. dendriticum*, *D. hospes* e *Dicrocoelium chinensis* (Otranto, *et al.*, 2007).

Após otimização da técnica de PCR para este par de primers (temperatura de *annealing* de 60°C e adição de 5% de DMSO), os testes de especificidade revelaram que estes tinham a capacidade de amplificar DNA de *D. dendriticum*, como descrito na literatura (Sharroks, 1994 e Otranto, *et al.*, 2007), mas também DNA de *F. hepatica*. Os testes de sensibilidade apuraram que este par de primers tinha, inclusivamente, uma maior capacidade de deteção de DNA de *F. hepatica* (0,1ng/ µL) do que *D. dendriticum* (2,5ng/µL), pelo que se deve diferenciar de entre as duas espécies se apenas houver deteção por PCR e não houver informação morfológica.

Como anteriormente, não houve qualquer amplificação, inclusivamente do controlo positivo, quando se testou a capacidade destes primers detetarem o DNA dos parasitas na presença de DNA dos hospedeiros (ovino e bovino) e não foi possível determinar a causa dentro da duração deste projecto. Igualmente, a amplificação das amostras seleccionadas e das pools foi negativa.

De igual modo, futuramente seria também importante testar o DNA do parasita em diluições cada vez menores com DNA do hospedeiro (1:10, 1:100 e 1:1000) sem água destilada. Isto para garantir que em quantidades mínimas de DNA do parasita em DNA do hospedeiro, este seria detetado.

4 – Desenvolvimento de “Primers” internos para nested PCR

Como a sensibilidade da técnica de PCR com os “Primers” descritos na literatura não seria suficiente para detetar o DNA destes parasitas em amostras e ao mesmo tempo fazer o diagnóstico diferencial do(s) parasita(s) envolvido(s) na infeção, considerou-se ser importante desenvolver uma técnica de *nested-PCR* específico para os parasitas estudados neste projeto.

Os “Primers” JB3/JB4.5 amplificam o gene mitocondrial COI em duas das espécies estudadas neste projeto, assim como provavelmente outros parasitas helmintas. Como tal foram desenhados “Primers” internos (de modo a amplificar um fragmento com um tamanho de aproximadamente 300pb) para amplificação diferencial de *F. hepatica* (JB3n-Fh/JB4.5n-Fh) e *E. granulosus* (JB3n-Eg/JB4.5n-Eg).

Como a região ITS2 amplificada com os “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1, amplificaram *D. dendriticum* e *F. hepatica*, foi desenhado o primer interno Dd58SF1n1 para utilizar em conjunto com o primer Dd28SR1, capaz de amplificar um fragmento de aproximadamente 600pb que inclui a região ITS2 de *D. dendriticum*, em *semi-nested-PCR*

4.1 – Otimização dos “Primers” internos

4.1.1 – Amplificação do gene mitocondrial COI com os “Primers” JB3n-Eg/JB4.5n-Eg e JB3n-Fh/JB4.5n-Fh e da região ribossomal ITS2 com os “Primers” Dd58SF1n1/Dd28SR1.

Apesar de terem sido efetuadas várias reações com estes primers, utilizando DNA dos controlos positivos e produtos de amplificação de reações anteriores, não se conseguiu obter nenhuma amplificação, com exceção de um produto de amplificação de DNA de *F. hepatica*, onde foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 300pb às 3 temperaturas testadas (45, 50 e 55°C), tendo no entanto os dois controlos

positivos (primeira reação e segundo reação) sido negativo, este facto indica que mais estudos seriam necessários.

Estes resultados podem dever-se à deterioração das amostras devido a terem sido várias vezes descongeladas e congeladas, mas pode também dever-se à deterioração de algum dos componentes da mix de PCR, e como tal seria importante efetuar alguns testes para perceber se seria algum destes que estaria degradado. Futuramente seria importante voltar a extrair DNA dos controlos positivos e novas reações de PCR com os primers externos, para garantir que o DNA utilizado com os primers internos seria de qualidade, realizar alguns testes com os componentes da mix de PCR para averiguar se seria algum destes que estaria degradado e em último caso voltar a desenhar novos primers internos.

5 – Sequenciação

Como alguns conjuntos de “Primers” são capazes de amplificar em espécies diferentes, esses produtos de amplificação de espécies diferentes tinham um tamanho semelhante do produto esperado e também para se confirmar que a região amplificada seria a região desejada, sequenciaram-se alguns produtos de amplificação por PCR de diversos alvos, para as espécies testadas. Foram também sequenciados os produtos de amplificação de um exemplar de *F. hepatica* encontrado durante a recolha de amostras, no fígado de um bovino, no matadouro de Pedrogão Grande.

Obteve-se sequências para as amostras Fasc1, Fasc2, Fasc3, Fasc4, Dicro1 e Eg1, com qualidade suficiente para se poder gerar uma sequência consenso, mas não para a amostra Dicro2 (ITS2). Seria importante voltar a extrair DNA de *D. dendriticum* e amplificá-lo novamente para garantir que a quantidade de DNA enviada para sequenciação fosse suficiente. Isto não foi efetuado neste trabalho devido às limitações de tempo.

6 – Análise filogenética

Analisou-se filogeneticamente as sequências estudadas (Fasc1, Fasc2, Fasc3, Fasc4, Dicro1 e Eg1) em relação a outras da mesma espécie obtidas no “GenBank”, após a pesquisa por “BLAST” e incluindo um grupo externo.

Confirmou-se que as amostras Fasc1 e Fasc2, pertencem à espécie *F. hepatica*. Estas amostras eram indistinguíveis para o fragmento amplificado do gene COI de duas outras sequências de *F. hepatica* oriundas do continente americano, mais precisamente dos EUA (M93388 e X15613), sendo que a amostra Fasc2 era também indistinguível de outras duas do continente africano (GQ231548 e GQ231549, da Tunísia e Argélia, respetivamente). As diferenças entre Fasc1 e Fasc2 estavam relacionadas com o tamanho, visto que a sequência de Fasc1 tinha um tamanho superior a Fasc2, e apresentavam entre si um único local polimórfico. Ambas as sequências apresentavam também uma grande semelhança com sequências oriundas do continente europeu, onde esta espécie foi inicialmente descrita por Linnaeus em 1758 (Lofty, *et al.*, 2008), mais precisamente com sequências de exemplares Italianos (JF824673, JF824672, JF824671 e JF824679) observando-se apenas dois locais polimórficos entre elas, sendo que, Fasc1 era também muito semelhante a uma sequência Chinesa (AJ628039), apresentando apenas um único local polimórfico. A diferença entre os resultados de Fasc1 e Fasc2 poderá estar relacionada com o tamanho do fragmento, visto que, quanto menor for o fragmento analisado menor será a diversidade genética. Contudo, confirma-se a afinidade das amostras Portuguesa com outras Europeias, sendo as primeiras sequências para este alvo a serem obtidas em Portugal de *F. hepatica*.

As sequências de Fasc3 e Fasc4 pertenciam ao exemplar encontrado aquando da recolha de amostras, e após a análise filogenética da amostra Fasc3 (região ITS1), verificou-se que esta era diferente de todas as sequências de *F. hepatica* existentes na base de dados para a região ITS1, estando mais próxima filogeneticamente de amostras do continente asiático (AJ628432, AJ628431, EF612469 e EF612468), do continente africano (EF612467 e EF198867) e do continente americano (AJ243016), com um único local polimórfico de diferença entre as sequências referidas e a sequência estudada. Este será portanto um novo haplótipo de ITS1 para *F. hepatica* e a primeira sequência obtida desta região para esta espécie em Portugal.

Na análise filogenética da amostra Fasc4 para a região ITS2 verificou-se que esta era diferente de todas as sequências de *F. hepatica* existentes na base de dados para a região ITS2, estando próxima filogeneticamente em especial das sequências JN585288 (Turquia), AB536918 (Vietnam), AB553720 (Egipto), AB553721 (Egipto), FJ593632 (Turquia), FJ467927 (Malásia), FJ459806 (Turquia), AB207150 (Japão), AB207148 (Austrália) e AB010978 (Japão), (que eram todas idênticas entre si), e apresentavam apenas 2 locais polimórficos em relação à sequência de Fasc4. Confirmando os resultados obtidos para ITS1, este será um novo haplótipo de ITS2 para *F. hepatica* e a primeira sequência obtida de Portugal.

Após a análise filogenética da amostra Dicro1 para a região ITS2, verificou-se que esta era idêntica às duas sequências disponíveis de *D. dendriticum* na base de dados, JQ966973 e JQ966972, ambas provenientes do Irão. Em relação às outras espécies do género *Dicrocoelium* verificou-se que existiam algumas diferenças filogenéticas, a espécie *D. orientalis* apresentava uma diferença de um único local polimórfico para a região estudada e a espécie *D. hospes* uma diferença de 3 locais polimórficos. Esta foi a primeira sequência obtida para Portugal de *D. dendriticum* e sugere que a região ITS não é suficientemente polimórfica para estudos de diversidade intra específica desta espécie.

Através da análise filogenética da amostra Eg1 (região COI), verificou-se que esta era idêntica a 4 outras sequências de *E. granulosus* para o gene COI existentes na base de dados, duas delas Portuguesas (FN646371 e FN646369) e duas da Turquia (HM598451 e HM598451) e estava próxima filogeneticamente de outras encontradas por todo o mundo. Estes resultados são esperados, e consistentes com as amostras Portuguesas de *E. granulosus* publicados.

7 – Análise estatística

Com a técnica de deteção por PCR não foi possível detetar a presença dos parasitas nas amostras e pools estudadas, apesar de na maior parte os controlos positivos terem amplificado. Este resultado pode refletir a prevalência verdadeira, visto não se terem detetado parasitas na maioria das amostras, mas também poderá dever-se à falta de sensibilidade da técnica e possivelmente à distribuição heterogênea de parasitas no

órgão. Idealmente, deveriam retirar-se amostras de diferentes locais no órgão, assim como usar métodos mais sensíveis de detecção como nested-PCR.

No entanto, aquando da recolha de amostras, foi detetado um exemplar de *F. hepatica* no interior do fígado de um bovino, o que num universo de 100 amostras representa uma prevalência de 1% (intervalo de confiança de 0-5%, nível de confiança de 0.95). O valor obtido é compatível com um estudo realizado em Portugal, no conselho de Odemira (Cardozo, 2010), onde foi detetada uma prevalência de 3,7% em bovinos através de técnicas serológicas, mas muito mais baixo em relação a outro estudo efectuado no Norte de Portugal e Noroeste de Espanha (Arias, *et al.*, 2011), onde foi detetada uma prevalência de 28% em bovinos. Contudo, neste trabalho não se incluíram animais que se soubesse provirem do Norte de Portugal, pelo os valores obtidos não são comparáveis, mas apenas aplicáveis às regiões Centro e Sul. Futuramente seria importante realizar um estudo onde fossem também incluídos animais do norte de Portugal.

Quando a *E. granulosus* e a *D. dendriticum* foi detetada uma prevalência de 0% (com um intervalo de confiança de 0 a 2%). O valor obtido para *E. granulosus* é consistente com o que tinha sido descrito num estudo realizado em Portugal (David de Moraes, 1998), onde foi detetada uma prevalência de hidatidose animal de 0,3% no distrito de Castelo Branco e de 6% no Distrito do Porto. Em relação à prevalência de *D. dendriticum*, segundo Cordero (1980), esta seria uma parasitose muito disseminada na península ibérica, mas poucos dados existem para apoiar estas afirmações. Num estudo realizado na província de León (Espanha) foi detetada uma prevalência de 37,64% em bovinos (Gonzalez-Lanza, *et al.*, 1993).

Em futuros estudos seria importante voltar a abordar o impacto que estas parasitoses possam ter e alargar o número de animais estudados para a margem de erro ser menor, já tendo em atenção os resultados preliminares obtidos neste estudo.

Capitulo VI – Conclusões

Capítulo VI – Conclusões

Este estudo procurou contribuir para a estimar a prevalência e a distribuição de helmintos causadas por *F. hepatica*, *D. dendriticum* e *E. granulosus*, em animais abatidos em matadouros de Portugal, principalmente em ovinos e bovinos, e perceber se as metodologias atualmente utilizadas são eficazes na deteção dos parasitas, ou se há parasitoses presentes que não são detetadas ou reportadas.

As técnicas moleculares para o estudo e diagnóstico de parasitoses têm sido cada vez mais utilizadas, devido à capacidade de deteção de quantidades mínimas de DNA de parasitas. Como tal será importante desenvolver uma técnica que permita realizar o rastreio e ao mesmo tempo efetuar o diagnóstico diferencial destas helmintos em animais abatidos em matadouros. Neste trabalho avaliaram-se diferentes alvos (gene mitocondrial COI e as regiões ribossomais ITS1 e ITS2) para amplificação das três espécies. Uma das combinações apenas amplificou DNA dos hospedeiros, podendo ser usado como controlo de qualidade do DNA extraído para PCR. Os outros alvos não se revelaram suficientemente sensíveis, nem específicos para espécie, pelo que é necessário sequenciar os produtos (ou analisar com outro método) ou usar um 2º PCR (nested-PCR) para melhorar tanto a sensibilidade como a especificidade. Neste trabalho foram desenhados primers para nested-PCR de alvos diferentes. Será necessário realizar mais estudos, até se obter uma técnica sensível e específica.

Os resultados obtidos com a sequenciação indicam que foi encontrado um novo haplótipo para as regiões ITS1 e ITS2 de *F. hepatica* numa amostra obtida neste trabalho. As outras amostras tinham um haplótipo de COI já conhecido, assim como *E. granulosus* e *D. dendriticum*.

Quanto a *F. hepatica*, detetou-se um animal parasitado aquando da inspeção visual da carcaça, pelo que a prevalência estimada neste trabalho é de cerca de 1% (0 a 5%, a um nível de confiança de 0.95). A prevalência de *D. dendriticum* e *E. granulosus* foi estimada entre 0 e 2% (a um nível de confiança de 0.95), visto não se ter detetado parasitas, seja visualmente ou por técnicas moleculares.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

Agnihotri, R.K., 2005. Helminthic infection of livestock and their eco-Friendly management. *Department of veterinary parasitology/college of veterinary & animal sciences*. 1-6.

Ahmadi, N. A. Meshkehkar, M. 2010. Prevalence and long term trend of liver fluke infections in sheep, goats and slaughtered in Khuzestan, Southern Iran. *Journal of Paramedical Sciences*. 1(2): 26-31.

Ahmedi, R. Sikejor, E.M. and Maleki, M. 2011. Prevalence of *Dicrocoelium dendriticum* infection in cattle, sheep and goat in Gilan province, Northern Iran. *Journal of animal and veterinary advances*. 9(21): 2723-2724.

Ai, L. Chen, M. Alasaad, S. Elsheikha, S. Li, J. Li, H. Lin, R. Zou, F. Zhu, X. & Chen, J. 2011. Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola spp.* by molecular approaches. *Parasite & Vectors*.4:101.

Andersen, F.L., Ouhelli, H. &Kachani, M., 1997.*Compendium On Cystic Echinococcosis – In Africa And In Middle Eastern Countries With Special Reference To Morocco*, 1st Edition, Brigham Young University, EUA.

Arias, M. Lomba, C. Dacal, V. Vázquez, L. Pedreira, J. Francisco, I. Piñeiro, P. Cazapal-Monteiro, C. Suarez, J.L. Diez-Baños, P. Marrondo, P. Sánchez-Andrade, R. Paz-Silva, A. 2011. Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Veterinary Record*. 168,408.

Badaraco, J.L., Ayala, F.J., Bart, J.M., Gottstein, B. & Haag, K.L. 2008.Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. *ExpParasitol*, 119(4): 453-459.

Beato, S. 2009. *Contributo para a caracterização molecular de Echinococcus granulosus em Portugal*. Tese de Mestrado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa.

Bowles, J. & McManus, D.P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol*. 54: 165-174.

Bowles, J. & McManus, D.P. 1993a. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol.* 23(7): 969-972.

Bowles, J. & McManus, D.P. 1993b. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop.* 53(3-4): 291-305.

Bowles, J. & McManus, D.P. 1993c. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol.* 57(2): 231-239.

Brown, L. D, Cat, T & DasGupta, A. 2001. Interval Estimation for a proportion. *Statistical Science* 16:101-133

Cameron, P. Colwell, G & Colwell, D. 2007. Epidemiological characteristics of an invading parasite: *Dicrocoelium dendriticum* in sympatric wapiti and beef cattle in southern Alberta, Canada. *J. Parasitol.* 93(3):491–494.

Campo, R. Manga-Gonzalez, M.Y. Gonzalez-Lanza, C. Rollinson, D. and Sandoval, H. 1998. Characterization of adult *Dicrocoelium dendriticum* by isoelectric focusing. *Journal of helminthology.* 72:109-116.

Cardozo, J. *Contribuição para o estudo do parasitismo gastrointestinal e hepático em bovinos de carne em regime extensivo no Concelho de Odemira*. Lisboa: Tese de Mestrado - Universidade técnica de Lisboa/Faculdade de Medicina Veterinária, 2010.

Carmena, D., Sanchez-Serrano, L.P. & Barbero-Martinez, I. 2008. *Echinococcus granulosus* infection in Spain. *Zoonoses Public Health*, 55(3): 156-165.

Cengiz, Z. Yilmaz, H. Dülger, A. and Çiçek, M. 2010. Human infection with *Dicrocoelium dendriticum* in Turkey. *Ann Saudi Med.* 30(2): 159–161.

Chrieki, M. 2002. Echinococcosis - An Emerging Parasite In The Immigrant Population. *Am Fam Physician*, 66(5): 817-820.

Cordero-del-Campillo, M. & Rojo-Vázquez, F.A. 1999. *Parasitología Veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill.

Costa, A. 2010. *Fasciolose bovina: Aspetos clínicos e epidemiológicos no Alentejo*. Lisboa: Tese de Mestrado - Universidade técnica de Lisboa/Faculdade de Medicina Veterinária.

Craig, P.S., McManus, D.P., Lightowers, 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(6): 385-394.

Cuesta-Bandera, C., McManus, D.P. & Rishi, A.K. 1988. Characterization of *Echinococcus granulosus* of Spanish origin by DNA restriction endonuclease analysis and Southern blot hybridization. *Int J Parasitol*, 18(1): 137-141.

Ducommun, D. and Pfister, K. 1991. Prevalence and distribution of *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* infections in cattle in Switzerland. *Parasitol Res*. 77:364-366

Dalimi, A., Sattari, A. & Motamedi, G. 2006. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. *Vet Parasitol*, 142(1-2): 129-133.

Dar, Y., Amer, S. Mercier, A., Courtioux, B. & Dreyfuss, G. 2012. Molecular identification of *Fasciola spp.* (Digenea: Fasciolidae) in Egypt. *Parasite*. 19(2):177-82.

David De Morais, J.A. 1998. *A Hidatidologia Em Portugal*. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 334 Páginas.

Direção-geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR). 2009. *Anuário pecuário 2008/09* [Online]. Lisboa: Ministério da Agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas. Disponível: http://www.gpp.min-agricultura.pt/pbl/Period/Anuario_Pec_2008-09.pdf [Acesso: 23 Setembro 2012].

Dorchies. 2006. *Flukes: Old Parasites But New Emergence*. XXIV World Buiatrics Congress. Nice, France: 322-336.

Duarte, A. 2004. *Inspeção Sanitária: Harmonização e reavaliação prementes?* Porto: Tese de mestrado em saúde pública, Universidade de Medicina do Porto.

Eckert, J. & Thompson, R.C. 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop*, 64(1-2): 19-34.

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*. World Organisation For Animal Health. Paris. 286 Páginas.

Ekstam, B., Johansson, B., Dinnézt, P. & Ellstrom. 2011. Predicting risk habitats for the transmission of the small liver fluke, *Dicrocoelium dendriticum* to grazing ruminants. *Geospatial Health*. 6(1): 125-131.

Espinoza, J.R. Terashima, A. Herrera-Velit, P. & Marcos, L.A. 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Rev Peru Med. Exp. Salud Publica*. 27(4): 604-12.

Euzeby, J. 1991. The epidemiology of hydatidosis with special reference to the Mediterranean area. *Parassitologia*, 33(1): 25-39.

Folmer, O.; Brack, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. e Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294-299.

Gasser, R.B. & Chilton, N.B. 1995. Characterisation of Taeniid Cestode Species by PCR-RFLP of ITS2 Ribosomal DNA. *Acta Trop*, 59(1): 31-40.

Ghazani, M.H.M., Valilou, M.R., Ahmadzadeh, A.R., Karami, A.M., & Zirak, K. 2008. The prevalence of sheep liver trematodes in the Northwest region of Iran. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*. 32(4): 305-307.

Gonzalez-Lanza, C. Manga-Gonzalez, M.Y. Del-Pozo-Carnero, P. 1993. Coprological study of the *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in Leon Province, Northwest Spain. *Parasitol. Res*. 79:488-491.

Grácio, M.A.A., Jorge, F., Trinca, A. 2002. Human hydatid disease in Portugal: diagnosed cases and a seroepidemiological survey. *Acta Tropica* 83(S1): S118.

Hirvela-Koski, V., Haukisalmi, V., Kilpela, S.S., Nylund, M. & Koski, P. 2003. *Echinococcus granulosus* in Finland. *Vet. Parasitol.*, 111(2-3): 175-192.

Hope, M., Bowles, J. & McManus, D.P. 1991. A reconsideration of the *Echinococcus granulosus* strain situation in Australia following RFLP analysis of cystic material. *Int J Parasitol*, 21(4): 471-475.

Ibrahim, M.M., Al Ghamdi, M.A. & Al Ghamdi, M.S. 2008. Helminths community of veterinary importance of livestock in relation to some ecological and biological factors. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*. 32(1): 42-47.

Jeandron, A. Rinaldi, L. Abdylidaeva, G. Usubalieva, J. Steinmann, P. Cringoli, G. and Utzinger, J. 2011. Human Infections with *Dicrocoelium dendriticum* in Kyrgyzstan: The Tip of the Iceberg? *J. Parasitol.*, 97(6). 1170–1172

Jenkins, D.J., Romig, T. & Thompson, R.C. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus spp.* - A global update. *Int J Parasitol*, 35(11-12): 1205-1219.

Jorge, F.M. 2000. *Hidatidose Humana no distrito de Castelo Branco contribuição para o seu conhecimento*. Tese De Mestrado. IHMT – Universidade Nova De Lisboa. 83 Páginas.

Kadir, M.A., & Rasheed, S.A. 2008. Prevalence of some parasitic helminths among slaughtered ruminants in Kirkut slaughterhouse, Kirkut, Iraq. *Iraqi journal of veterinary Sciences*. 22(2): 81-85.

Kara, M., Gicik, Y., Sari, B., Bulut, H., & Arslan, M.O. 2009. A Slaughterhouse study on prevalence of some Helminths of cattle and sheep in Malatya Province, Turkey. *Journal of animal and veterinary advances*. 8(11): 2200-2205.

Lagares, A. 2008. *Parasitose de pequenos ruminantes na região da cova da beira*. Tese de mestrado, Universidade Técnica de Lisboa/Faculdade de medicina Veterinária.

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(Pt 3): 207-215.

Lewall, D.B. 1998. Hydatid Disease: Biology, Pathology, Imaging And Classification. *Clin. Radiol*. 53(12): 863-874.

Li, T., Ito, A., Nakaya, K., Qiu, J., Nakao, M., Zhen, R., Xiao, N., Chen, X., Giraudoux, P. & Craig, P.S. 2008. Species identification of human echinococcosis using histopathology and genotyping in northwestern China. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102(6): 585-590.

Lofty, W.M., Brant, S.V., DeJong, R.J., Le, T.H., Demiasziewick, A. R.V., Vijitha, B.J.R., Perera, V.P., Laursen, J.R. & Loker, E.S. 2008. Evolutionary Origins, Diversification, and Biogeography of Liver Flukes (*Digenea, Fasciolidae*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79(2): 248–255.

Magi, B. Frati, E. Bernini, L. Sansoni, A. Zanelli, G. 2009. *Dicrocoelium dendriticum*: a true infection?. *Le Infezioni in Medicina*, 2:115-116.

Manga-Gonzalez, M.Y. Gonzalez-Lanza, C. Cabanas, E. and Campo, R. 2001. Contributions to and review of dicrocoeliosis, with special reference to the intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitology*. 123:91-114.

Marques, S.M.T. & Scroferneker, M.L. 2003. Fasciola hepatica infection in cattle and buffaloes in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Parasitol. Latinoam.* 58: 169-172.

Maurelli, M. Rinaldi, L. Capuano, F. Perugini, A. G. Veneziano, V. and Cringoli, G. 2007. Characterization of the 28S and the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium hospes*. *Parasitology Research*. 101(5): 1251-1255

McManus, D.P. & Thompson, R.C. 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*, 127 Suppl: S37-51.

McManus, D.P. 2002. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96 Suppl 1: S151-157.

McManus, D.P. 2006. Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitol Int*, 55 Suppl: S31-37.

Miguel, P. 2009. O veterinário inspetor no Matadouro. Estudo de fígados rejeitados de bovino. Lisboa: Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa-Faculdade de medicina veterinária.

Mitchell, G. 2002. Farm Animal Practice: Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Practice*.24:7 378-385.

Naidich, A., McManus, D.P., Canova, S.G., Gutierrez, A.M., Zhang, W., Guarnera, E.A. & Rosenzvit, M.C. 2006. Patent and pre-patent detection of *Echinococcus granulosus* genotypes in the definitive host. *Mol Cell Probes*, 20(1): 5-10.

Nakao, M., McManus, D.P., Schantz, P.M., Craig, P.S. & Ito, A. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*. 134(Pt 5): 713-722.

Nakao, M., Sako, Y., Yokoyama, N., Fukunaga, M. & Ito, A. 2000. Mitochondrial Genetic Code In Cestodes. *Mol Biochem. Parasitol*. 111(2): 415-424.

Neves, D., Melo, A., Linardi, P., & Vitor, R. 2007. *Parasitologia Humana*. São Paulo, Editora Atheneu.

Otranto, D. Rehbein, S. Weigl, S. Cantacessi, C. Parisi, A. Lia, R.P. Olson, P.D. 2007. Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta Tropica*. 104 (2007) 91–98.

Pawlowski, Z. & Stefaniak, J. 2003. The pig strain of *Echinococcus granulosus* in humans: a neglected issue?. *Trends in Parasitol*, 19(10): 439.

Ponce Gordo, F. 1995. *Caracterización Biológica De Las Cepas De Echinococcus Granulosus De Origen Español*. Tesis Doctoral. Madrid. 373 Páginas.

Pritchard, G.C. Forbes, A.B. Williams, D.J. Salimi-Bejestani, M.R. Daniel, R.G. 2005. Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. *Vet Rec*. 5;157(19):578-82.

Radfar, M.H. & Iranyar, N. 2004. Biochemical Profiles Of Hydatid Fluids Of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Veterinarski Archiv*, 74(6): 435-442.

Raether, W. & Hanel, H. 2003. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. *Parasitol Res*, 91(5): 412-438.

Rangel-Ruiz, L.J.Marquez-Izquierdo, R. Bravo-Nogueira, G. 1999. Bovine fasciolosis in Tabasco, Mexico. *VetParasitol.* 81(2):119-27.

Rey, L. 2002. *Bases da Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Romig, T. 2003. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg*, 388(4): 209-217.

Romig, T., Dinkel, A. & Mackenstedt, U. 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int*, 55 Suppl: S187-191.

Schweiger, F. e Kuhn, M. 2008. *Dicrocoelium dendriticum* infection in a patient with Crohn's disease, a brief communication. *Can J Gastroenterol.* 22(6):571-573.

Shahzeem, W. Mehmood, K. Munir, R. Aslam, W. Ijaz, M. Ahmad, R. Khan. M.S. & Sabir, A.J. 2012. Prevalence and Molecular Diagnosis of *Fasciola hepatica* in Sheep and Goats in Different Districts of Punjab, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*.

Singh, B. 1997. Molecular Methods For Diagnosis And Epidemiological Studies Of Parasitic Infections. *Int J For Parasitol.* 27(10): 1135-1145.

Soliman, M.F.M. 2008. Epidemiological review of human and animal fascioliasis in Egypt. *J. Infect Developing Countries.* 2(3): 182-189.

Sunita, T., Dubey, M.L., Khurana, S., & Malla, N. 2007. Specific antibody detection in serum, urine and saliva samples for the diagnosis of cystic Echinococcosis. *Acta Trop.* 101(3): 187-191.

Taha, H. 2012. Genetic variations among *Echinococcus granulosus* isolates in Egypt using RAPD-PCR. *Parasitol Res.*

Thompson, R.C. 2008. The Taxonomy, Phylogeny and Transmission of Echinococcus. *Exp. Parasitol*, 119(4): 439-446.

Thompson, R.C., Constantine, C.C. & Morgan, U.M. 1998. Overview and significance of Molecular Methods: What Role For Molecular Epidemiology? *Parasitology*, 117 Suppl: S161-175.

Trinca, A.A.T.C. 2001. *Contribuição para o imunodiagnóstico da Hidatidose*. Dissertação para acesso à categoria de Investigador Auxiliar. IHMT – Universidade Nova De Lisboa. 134 Páginas.

Urquhart, G.M. Armour, J. Duncan, J.L. & Jennings, F.W. 1996. *Parasitologia Veterinária*. (2ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.

Varcasia, A., Pipia, A.P., Scala, A., Brianti, E., Giannetto, S., Battelli, G., Poglayen, G. & Micagni, G. 2008. Cystic echinococcosis in equids in Italy. *Parasitol Res*. 102(4): 815-818.

Vicidomini, S., Cancrini, G., Gabrielli, S., Naspetti, R. & Bartoloni, A. 2007. Muscular cystic hydatidosis: case report. *BMC Infect Dis*, 7: 23.

WHO(World Health Organization). 2006. *Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control*. WHO headquarters. Geneva, Switzerland. 17–18 October.

World Health Organization 2012a. *Zoonoses*. [online]. World Health Organization. Disponível: (<http://www.who.int/topics/zoonoses/en/>). [Acesso: 20 Janeiro 2012].

World Health Organization 2012b. *Zoonoses and veterinary public health (VPH)* [online]. World Health Organization. Disponível: <http://www.who.int/zoonoses/en/>. [Acesso: 20 Janeiro 2012].

Yildirim, A. Ica, A. Duzlu, O. & Inci, A. 2007. Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* in cattle from Kayseri province, Turkey. *Reveu Médecine Vétérinaire*. 158: 613-617.

Yuksel, M., Demirpolat, G., Sever, A., Bakaris, S., Bulbuloglu, E. & Elmas, N. 2007. Hydatid Disease Involving Some Rare Locations In The Body: A Pictorial Essay. *Korean J Radiol*, 8(6): 531-540.

Zanini, F., Gonzalo, R., Perez, H., Aparici, I., Soto, X., Guerrero, J., Cerrone, G. & Elissondo, C. 2006a. Epidemiological surveillance of ovine hydatidosis in Tierradel Fuego, Patagonia Argentina, 1997-1999. *VetParasitol*. 138(3-4): 377-381.

Zanini, F., Laferrara, M., Bitsch, M., Perez, H. & Elissondo, M.C. 2006b. Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of the patagonian grey fox (*Pseudalopexgriseus*) in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina. *Vet Parasitol*, 136(3-4): 329-334.

Zanini, F., Laferrara, M., Bitsch, M., Perez, H. & Elissondo, M.C. 2006b. Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of the patagonian grey fox (*Pseudalopexgriseus*) in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina. *Vet Parasitol*. 136(3-4): 329-334.

Zhang, W.B., Li, J., Li, Q., Yang, D., Zhu, B., You, H., Jones, M.K., Duke, M., McManus, D.P. 2007. Identification of a diagnostic antibody-binding region on the immunogenic protein EpC1 from *Echinococcus granulosus* and its application in a population screening for cystic Echinococcosis. *Clinical and Experimental Immunology. British Society for Immunology, Clinical and experimental immunology*, 149: 80-86.

Lista de figuras e tabelas

Lista de figuras e tabelas

Figura 1: Exemplar do Parasita adulto de <i>E. granulosus</i>	11
Figura 2: Ovo de <i>E. granulosus</i>	11
Figura 3: Ciclo biológico de <i>E. granulosus</i>	14
Figura 4: Exemplo de um Quisto hidático no fígado de ovino;	16
Figura 5A: TAC de um quisto hidático calcificado no quadrante superior do abdómen de um homem de 28 anos.	19
Figura 5B: Ecografia de um quisto hidático no fígado de um homem de 25 anos.	19
Figura 6: Distribuição mundial de <i>E. granulosus</i>	22
Figura 7: Exemplar de um parasita adulto de <i>F. hepatica</i>	26
Figura 8: Ovo de <i>F. hepática</i>	26
Figura 9A: Rédia de <i>F. hepática</i>	28
Figura 9B: Cercária de <i>F. hepatica</i>	28
Figura 10: Ciclo biológico de <i>F. hepática</i>	30
Figura 11: Exemplar de um parasita adulto de <i>D. dendriticum</i>	40
Figura 12: Ovo de <i>D. dendriticum</i>	41
Figura 13: Ciclo biológico de <i>D. dendriticum</i>	43
Figura 14: Mapa de Portugal com as regiões estudadas e o número de animais de cada região abatidos em cada matadouro	70
Figura 15: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI.....	71
Figura 16: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI.....	72
Figura 17: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI.....	72
Figura 18: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI.....	73
Figura 19: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI.....	74
Figura 20: Resultados de PCR com “Primers” LCO1490/HCO2198 que amplificam um fragmento com aproximadamente 710pb do gene COI.....	74

Figura 21: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI.....	75
Figura 22: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI.....	76
Figura 23: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI.....	76
Figura 24: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI.....	77
Figura 25: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI.....	77
Figura 26: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI.....	78
Figura 27: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI.....	78
Figura 28: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI.....	79
Figura 29: Resultados de PCR com “Primers” JB3/JB4.5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460pb do gene COI.....	79
Figura 30: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1	80
Figura 31: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1	81
Figura 32: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1	82
Figura 33: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1	82
Figura 34: Resultados de PCR com “Primers” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1	82
Figura 35: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2.....	84
Figura 36: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2.....	84
Figura 37: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2.....	85

Figura 38: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2.....	86
Figura 39: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2.....	86
Figura 40: “Primers” externos (JB3/JB4.5) e “Primers” internos (JB3n-Eg/JB4.5n-Eg) alinhados com a sequência do gene COI de <i>E. granulosus</i>	87
Figura 41: “Primers” externos (JB3/JB4.5) e “Primers” internos (JB3n-Fh/JB4.5n-Fh) alinhados com a sequência do gene COI de <i>F. hepatica</i>	88
Figura 42: “Primers” externos (Dd58SF1/Dd28RF1) e primer interno (Dd58SF1n1) alinhados com a sequenciadas regiões 5.8S, ITS2 e 28S	88
Figura 43: Resultados de PCR com “Primers” JB3n-Eg/JB4.5n-Eg que amplificam um fragmento de aproximadamente 300pb do gene mitocondrial COI	89
Figura 44: Resultados de PCR com “Primers” JB3n-Eg/JB4.5n-Eg que amplificam um fragmento de aproximadamente 300pb do gene mitocondrial COI	90
Figura 45: Resultados de PCR com “Primers” JB3n-Fh/JB4.5n-Fh que amplificam um fragmento de aproximadamente 300pb do gene mitocondrial COI	91
Figura 46: Resultados de PCR com “Primers” JB3n-Fh/JB4.5n-Fh que amplificam um fragmento de aproximadamente 300pb do gene mitocondrial COI	91
Figura 47: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1n1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2	92
Figura 48: Resultados de PCR com “Primers” Dd58SF1n1/Dd28SR1 que amplificam um fragmento de aproximadamente 600pb da região ITS2	92
Figura 49 A/B/C/D: Alinhamento de Fasc1 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo.....	96
Figura 50: Rede filogenética de Fasc1 gerada com o programa “SplitsTree” usando distâncias de Kimura-2-Parameter em Neighbor-Net	98
Figura 51 A/B/C/D/E: Alinhamento de Fasc2 com as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo.....	99
Figura 52: Rede filogenética de Fasc2 gerada com o programa “SplitsTree” usando distâncias de Kimura-2-Parameter em Neighbor-Net	102
Figura 53 A/B/C/D/E/F: Alinhamento de Fasc3 com todas as obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo.....	103
Figura 54: Rede filogenética de Fasc3 gerada com o programa “SplitsTree” usando distâncias de Kimura-2-Parameter em Neighbor-Net	107

Figura 55 A/B/C/D: Alinhamento de Fasc4 com todas as sequências obtidas através da pesquisa por “BLAST” e grupo externo..... 108

Figura 56: Rede filogenética de Fasc4 gerada com o programa “SplitsTree” usando distâncias de Kimura-2-Parameter em Neighbor-Net 111

Figura 57: Alinhamento de Dicro1 com todas as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo..... 112

Figura 58: Rede filogenética de Dicro1 gerada com o programa “SplitsTree” usando distâncias de Kimura-2-Parameter em Neighbor-Net 113

Figura 59 A/B/C/D/E: Alinhamento de Eg1 com todas as sequências obtidas através de pesquisa por “BLAST” e grupo externo..... 114

Figura 60: Rede filogenética de Eg1 gerada com o programa “SplitsTree” usando distâncias de Kimura-2-Parameter em Neighbor-Net 116

Lista de Tabelas

Tabela 1: Constituição das pools de amostras.....	59
Tabela 2: Descrição do número de animais analisados proveniente de cada região por espécie	69
Tabela 3: Identificação dos “Primers”, sequências, região alvo e tamanho do fragmento amplificado	89
Tabela 4: Produtos de amplificação selecionados para sequenciação.....	93
Tabela 5: Identificação das amostras.....	155
Tabela 6: Quantificações das Pools de Ovino (fígado)	159
Tabela 7: Quantificações das Pools de ovino (Pulmão)	159
Tabela 8: Quantificações das pools de bovino (fígado)	159
Tabela 9: Quantificações das pools de bovino (pulmão).....	160
Tabela 10: Quantificações das amostras individuais de bovino (fígado)	160
Tabela 11: Quantificações das amostras individuais de bovino (pulmão)	160
Tabela 12: Quantificações das amostras individuais de ovino (fígado)	161
Tabela 13: Quantificações das amostras individuais de ovino (pulmão)	161
Tabela 14: Quantificações das amostras individuais de ovino (fígado) segunda extração	161
Tabela 15: Quantificações das amostras individuais de bovino (fígado) segunda extração.....	162
Tabela 16: Quantificações dos controlos positivos utilizados nas reações de PCR.....	162
Tabela 17: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Fasc1	164
Tabela 18: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Fasc2	165
Tabela 19: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Fasc3	166
Tabela 20: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Fasc4	169
Tabela 21: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Dicro1;	171
Tabela 22: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Eg1	172

ANEXO I

Identificação das amostras recolhidas

Tabela 5: Identificação das amostras.

Nº Amostra	Espécie	Sexo	Idade (Meses)	Data do abate	Código da Exploração
1	B	F	0-10	14-12-2011	VEA03
2	B	F	0-10	14-12-2011	VEA03
3	B	F	0-13	14-12-2011	VEA03
4	B	M	0-14	14-12-2011	RCM71
5	B	M	0-15	14-12-2011	SE3C6
6	B	M	0-12	14-12-2011	VEA03
7	O	ND	A	20-12-2011	VR36M
8	O	ND	A	20-12-2011	VR36M
9	O	ND	A	20-12-2011	VR36M
10	O	ND	A	20-12-2011	VR36M
11	O	M	A	20-12-2011	VD48M
12	B	M	0-14	20-12-2011	NW214
13	B	M	0-17	20-12-2011	KG43G
14	B	M	0-12	20-12-2011	KG6X9
15	B	M	0-22	20-12-2011	KG9Z6
16	B	M	0-15	27-12-2011	KG65J
17	B	M	0-15	27-12-2011	RD8S8
18	B	F	0-10	27-12-2011	RCL68
19	B	F	0-13	27-12-2011	RB96V
20	B	M	0-18	27-12-2011	KL50D
21	O	ND	A	27-12-2011	KH83M
22	O	ND	A	27-12-2011	KJ05D
23	O	ND	A	27-12-2011	KH57D
24	O	ND	A	27-12-2011	KH57D
25	O	ND	A	27-12-2011	VA13B
26	O	ND	A	27-12-2011	VA13B
27	O	ND	A	27-12-2011	VC34A
28	O	ND	A	27-12-2011	VA59A
29	O	ND	A	27-12-2011	VA13B
30	O	ND	A	27-12-2011	VC34A
31	O	ND	A	27-12-2011	KJ83Q
32	O	ND	A	03-01-2012	KG53A
33	O	ND	A	03-01-2012	KG53A
34	O	ND	A	03-01-2012	KG53A
35	O	ND	A	03-01-2012	KG53A
36	O	ND	A	03-01-2012	RG61K
37	O	ND	A	03-01-2012	RG61K
38	B	M	11	03-01-2012	SRA44
39	B	M	14	03-01-2012	RB8V5
40	B	M	20	03-01-2012	RG71H

41	B	M	14	03-01-2012	RX15B
42	B	M	12	03-01-2012	VW890
43	B	M	12	03-01-2012	VW890
44	B	M	29	03-01-2012	SG24E
45	B	M	15	03-01-2012	RG70A
46	B	M	15	03-01-2012	RG70A
47	B	F	12	03-01-2012	VW890
48	B	F	9	03-01-2012	SG9F8
49	B	F	12	03-01-2012	VW890
50	B	F	13	03-01-2012	SG9F8
51	B	F	10	03-01-2012	SG9F8
52	B	F	16	03-01-2012	SCA41
53	B	F	11	03-01-2012	RV01A
54	B	F	10	03-01-2012	SCA41
55	B	F	22	03-01-2012	RX15B
56	B	M	12	23-01-2012	VEA03
57	B	M	16	23-01-2012	VEA03
58	B	M	15	23-01-2012	VEA03
59	B	M	13	23-01-2012	VEA03
60	B	F	12	23-01-2012	VEA03
61	B	F	10	23-01-2012	VEA03
62	B	M	11	23-01-2012	VK93D
63	B	M	12	23-01-2012	VK93D
64	B	M	12	23-01-2012	VK93D
65	B	M	12	23-01-2012	VK93D
66	O	ND	A	31-01-2012	KG59A
67	O	ND	A	31-01-2012	KG59A
68	O	ND	A	31-01-2012	KG59A
69	O	ND	A	31-01-2012	KG59A
70	O	ND	A	31-01-2012	RS07D
71	O	ND	A	31-01-2012	VP34E
72	O	ND	A	31-01-2012	KG53A
73	O	ND	A	31-01-2012	RG61K
74	O	ND	A	31-01-2012	RG61K
75	O	ND	A	31-01-2012	RG61K
76	B	F	11	31-01-2012	SG9F8
77	B	F	13	31-01-2012	SG9F8
78	B	F	17	31-01-2012	SG9F8
79	B	F	12	31-01-2012	SG9F8
80	B	F	17	31-01-2012	SG9F8
81	B	F	12	31-01-2012	SG9F8
82	B	F	15	31-01-2012	SG9F8
83	O	ND	A	10-04-2012	KJ05D
84	O	ND	A	10-04-2012	KH57D
85	O	ND	A	10-04-2012	KH57D

86	O	ND	A	10-04-2012	VA13B
87	O	ND	A	10-04-2012	VA13B
88	O	ND	A	10-04-2012	VA13B
89	O	ND	A	10-04-2012	VC34A
90	O	ND	A	10-04-2012	VA59A
91	O	ND	A	10-04-2012	VA13B
92	O	ND	A	10-04-2012	KG53A
93	O	ND	A	10-04-2012	RG61K
94	O	ND	A	10-04-2012	KG59A
95	O	ND	A	10-04-2012	KG59A
96	O	ND	A	10-04-2012	KG59A
97	O	ND	A	10-04-2012	RG61K
98	O	ND	A	10-04-2012	RG61K
99	O	ND	A	10-04-2012	RG61K
100	O	ND	A	10-04-2012	RG61K

Legenda: Número da Amostra; Espécie: O- Ovino, B- Bovino; Sexo: M- Masculino, F- Feminino, ND: Não definido. Idade: A- Adulto, Número: meses; Data do abate: dia em que foi recolhida a amostra; Código de exploração: Referência da exploração de proveniência do animal.

Referências do Códigos de exploração:

- Entre Douro e Minho: A, B, C e D:
- Trás-os-Montes: E, F e G:
- Região Centro: H, J, K, L, M, N e O:
- Lisboa e Vale do tejo: R, S, T e U:
- Alentejo: V, W e X:
- Algarve: Y e Z:

ANEXO II

Quantificação da concentração de DNA, grau de pureza e quantidade de sais:

Tabela 6: Quantificações das pools de ovino (fígado).

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Pool 1 Ovino fígado	258,6	1,09	1,215
Pool 2 Ovino fígado	249,5	1,23	1,155
Pool 3 Ovino fígado	226,6	0,922	1,184
Pool 4 Ovino fígado	243,6	1,012	1,13
Pool 5 Ovino fígado	239,8	0,931	1,093
Média	243,62	1,037	1,1554

Valores da concentração de DNA (ng/μL); quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 7: Quantificações das pools de ovino (Pulmão).

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Pool 1 Ovino pulmão	239,8	0,817	1,16
Pool 2 Ovino pulmão	247,3	1,039	1,221
Pool 3 Ovino pulmão	243	1,12	1,189
Pool 4 Ovino pulmão	237	1,096	1,239
Pool 5 Ovino pulmão	226,6	1,185	1,293
Média	238,74	1,0514	1,2204

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 8: Quantificações das pools de bovino (fígado).

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Pool 1 Bovino fígado	232	0,905	1,23
Pool 2 Bovino fígado	231,3	0,953	1,2
Pool 3 Bovino fígado	230,5	0,98	1,177
Pool 4 Bovino fígado	227,4	0,968	1,159
Pool 5 Bovino fígado	232	0,95	1,172
Média	230,64	0,9512	1,1876

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 9: Quantificações das pools de bovino (pulmão).

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Pool 1 Bovino pulmão	231,8	0,971	1,256
Pool 2 Bovino pulmão	230,9	0,953	1,173
Pool 3 Bovino pulmão	229,4	0,972	1,162
Pool 4 Bovino pulmão	244,1	0,978	1,203
Pool 5 Bovino pulmão	233	0,962	1,129
Média	233,84	0,9672	1,1846

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 10: Quantificações das amostras individuais de bovino (fígado).

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Bovino 50 fígado	251,6	0,975	1,201
Bovino 52 fígado	243,3	0,974	1,199
Bovino 65 Fígado	248,7	0,943	1,224
Bovino 78 fígado	247,1	0,957	1,227
Bovino 81 fígado	242,2	0,957	1,266
Média	246,58	0,9612	1,2234

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 11: Quantificações das amostras individuais de bovino (pulmão).

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Bovino 50 pulmão	245,5	0,951	1,205
Bovino 52 pulmão	239,1	0,977	1,251
Bovino 65 pulmão	250,3	0,956	1,233
Bovino 78 pulmão	242,7	0,975	1,208
Bovino 81 pulmão	240,2	0,935	1,209
Média	243,56	0,9588	1,2212

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 12: Quantificações das amostras individuais de ovino (fígado).

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Ovino 8 fígado	244,8	0,97	1,297
Ovino 25 fígado	245,4	0,997	1,223
Ovino 33 fígado	253,1	1,02	1,238
Ovino 66 fígado	248	0,969	1,235
Ovino 98 fígado	245,4	0,989	1,172
Média	247,34	0,989	1,233

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 13: Quantificações das amostras individuais de ovino (pulmão).

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Ovino 8 pulmão	239,8	0,99	1,237
Ovino 25 pulmão	237,2	1,007	1,258
Ovino 33 pulmão	237,2	1,072	1,313
Ovino 66 pulmão	184,2	1,409	1,792
Ovino 98 pulmão	247,5	0,96	1,247
Média	229,18	1,0876	1,3694

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 14: Quantificações das amostras individuais de ovino (fígado) segunda extração.

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Ovino 8 fígado	232,7	1,033	1,27
Ovino 25 fígado	209,1	1,814	1,603
Ovino 33 fígado	240,1	0,904	1,172
Ovino 66 fígado	241,1	1,108	1,378
Ovino 98 fígado	248,6	0,952	1,23
Média	234,32	1,16	1,33

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 15: Quantificações das amostras individuais de bovino (fígado) segunda extração.

Identificação da Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Bovino 50 fígado	242,2	0,958	1,209
Bovino 52 fígado	241,5	0,975	1,208
Bovino 65 Fígado	241,2	0,969	1,202
Bovino 78 fígado	240,4	0,94	1,22
Bovino 81 fígado	239,3	0,936	1,226
Média	240,9	0,956	1,213

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza.

Tabela 16: Quantificações dos controlos positivos utilizados nas reações de PCR.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Quantidade de sais	Grau de pureza
Fasc4	102,2	1,95	1,958
Dicro1	25,9	2,313	1,738
Dicro2	23,2	2,252	1,669
Eg1	205,2	1,967	1,84

Valores da concentração de DNA (ng/μL), quantidade de sais e grau de pureza. Fasc4- *F. hepatica*; Dicro1- *D. dendriticum* exemplar 1; Dicro2- *D. dendriticum* 2 exemplar 2; Eg1- *E. granulosus*.

ANEXO III

Sequências utilizadas para gerar as redes filogenéticas:**Tabela 17:** Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Fasc1.

Código	Região geográfica	Parasita	Ano de publicação
M93388	EUA	<i>F. hepatica</i>	1989
X15613	EUA	<i>F. hepatica</i>	1989
AJ628039	China	<i>F. hepatica</i>	2006
AF216697	Austrália	<i>F. hepatica</i>	2000
AJ628037	China	<i>F. hepatica</i>	2006
AJ628038	China	<i>F. hepatica</i>	2006
AJ628036	China	<i>F. hepatica</i>	2006
JF824673	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824672	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824674	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824671	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824670	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
AJ628034	China	<i>F. hepatica</i>	2006
AJ628035	China	<i>F. hepatica</i>	2006
GU112471	Níger	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112470	Níger	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112469	Níger	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112456	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112455	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112454	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112483	EUA	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112482	EUA	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112481	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112479	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112478	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112477	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112476	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112457	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2011
GQ121276	Turquia	<i>F. hepatica</i>	2009
GQ231549	Argélia	<i>F. hepatica</i>	2009
GQ231548	Tunísia	<i>F. hepatica</i>	2009
GQ231551	Tunísia	<i>F. hepatica</i>	2009
GQ231550	Tunísia	<i>F. hepatica</i>	2009
GQ121277	Turquia	<i>F. gigantica</i>	2009
AJ628033	China	<i>F. gigantica</i>	2006
GU112468	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
GU112467	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
GU112466	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
GU112465	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
GU112463	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
GU112462	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
GU112461	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
GU112460	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
GU112459	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
GU112458	Níger	<i>F. gigantica</i>	2011
AJ628023	China	<i>F. gigantica</i>	2006
AJ628024	China	<i>F. gigantica</i>	2006
EF534997	R. Checa	<i>F. magna</i>	2008
EU769088	China	<i>Paragonimus sp.</i>	2009

Código: códigos de identificação da sequência no “GeneBak”; Região geográfica: país onde o parasita foi encontrado; Parasita: Espécie do parasita e Ano de Publicação da sequência.

Tabela 18: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Fasc2.

Código	Região geográfica	Parasita	Ano de Publicação
X15613	EUA	<i>F. hepatica</i>	1989
M93388	EUA	<i>F. hepatica</i>	1989
AF216697	Austrália	<i>F. hepatica</i>	2000
AJ628034	China	<i>F. hepatica</i>	2006
AJ628035	China	<i>F. hepatica</i>	2006
AJ628036	China	<i>F. hepatica</i>	2006
AJ628038	China	<i>F. hepatica</i>	2006
AJ628039	China	<i>F. hepatica</i>	2006
GQ231548	Tunísia	<i>F. hepatica</i>	2009
GQ231549	Argélia	<i>F. hepatica</i>	2009
GQ231550	Tunísia	<i>F. hepatica</i>	2009
GQ231551	Tunísia	<i>F. hepatica</i>	2009
GU112454	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112455	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112456	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112457	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112469	Níger	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112470	Níger	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112471	Níger	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112476	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112477	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112478	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112479	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112480	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112481	França	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112482	EUA	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112483	EUA	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112484	China	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112485	China	<i>F. hepatica</i>	2011
GU112486	China	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824670	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824671	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824672	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824673	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824674	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
AF025829	Austrália	<i>Echinostoma caproni</i>	2001
AF025830	Austrália	<i>Echinostoma caproni</i>	2001
AF025823	Austrália	<i>Echinostoma trivolis</i>	2001
AJ628022	China	<i>F. gigantica</i>	2006
AJ628023	China	<i>F. gigantica</i>	2006
AJ628024	China	<i>F. gigantica</i>	2006
AJ628025	China	<i>F. gigantica</i>	2006
AJ628026	China	<i>F. gigantica</i>	2006
AJ628027	China	<i>F. gigantica</i>	2006
AJ628028	China	<i>F. gigantica</i>	2006

Código: códigos de identificação da sequência no “GeneBak”; Região geográfica: país onde o parasita foi encontrado; Parasita: Espécie do parasita e Ano de Publicação da sequência.

Tabela 19: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Fasc3.

Código	País	Espécie	Ano de Publicação
JF496716	China	<i>F. hepatica</i>	2012
AM850107	Níger	<i>F. hepatica</i>	2009
AB514861	China	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514860	China	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514859	China	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514858	China	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514852	China	<i>F. hepatica</i>	2010
AB514851	China	<i>F. hepatica</i>	2010
AB514850	Irlanda	<i>F. hepatica</i>	2010
AB514849	Austrália	<i>F. hepatica</i>	2010
AB514848	Uruguai	<i>F. hepatica</i>	2010
AB514847	Uruguai	<i>F. hepatica</i>	2010
AM900370	Níger	<i>F. hepatica</i>	2008
AM709649	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709648	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709647	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709646	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709645	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709644	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709643	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709622	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709621	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709620	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709619	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709618	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709617	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709616	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709615	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709614	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709613	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709612	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709611	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709610	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709609	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709500	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709499	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709498	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM707030	Andorra	<i>F. hepatica</i>	2007
JF432077	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
JF432076	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
GQ231547	Tunísia	<i>F. hepatica</i>	2011
GQ321546	Tunísia	<i>F. hepatica</i>	2011
JF432078	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
JF432075	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
JF432072	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
JF432071	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
HM746786	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
HM746785	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
AB514871	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514870	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514869	Coreia do Sul	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514868	Coreia do Sul	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514867	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514866	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2010
GQ925431	Irão	<i>F. hepatica</i>	2009
JF295001	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2012

AM850108	Níger	<i>F. gigantica</i>	2009
AB514865	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514864	Coreia do Sul	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514863	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514862	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2010
AB514857	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2010
AB514856	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2010
AB514855	Zâmbia	<i>F. gigantica</i>	2010
AB514854	Tailândia	<i>F. gigantica</i>	2010
AB514853	Tailândia	<i>F. gigantica</i>	2010
AB514848	Uruguai	<i>F. hepatica</i>	2010
AM900371	Níger	<i>F. gigantica</i>	2008
AB553674	Egipto	<i>F. hepatica</i>	2011
JF496715	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496714	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496712	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496709	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496708	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496710	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496713	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF432074	Irão	<i>F. gigantica</i>	2011
JF432073	Irão	<i>F. gigantica</i>	2011
HM746788	Irão	<i>F. gigantica</i>	2011
HM746787	Irão	<i>F. gigantica</i>	2011
AB536912	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536907	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB553691	Egipto	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB553692	Egipto	<i>Fasciola spp.</i>	2011
EF027104	Índia	<i>F. gigantica</i>	2008
AB536916	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536915	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536914	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536913	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536910	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536909	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536908	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536906	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB553653	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2011
AB553664	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2011
AB553651	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2011
AB553652	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2011
AB477353	China	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB477352	China	<i>F. hepatica</i>	2009
AB385611	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB207145	Japão	<i>F. hepatica</i>	2009
AB207141	Irlanda	<i>F. hepatica</i>	2009
AB207140	Austrália	<i>F. hepatica</i>	2009
AB207139	Uruguai	<i>F. hepatica</i>	2009
AB207136	Uruguai	<i>F. hepatica</i>	2009
AB477356	China	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB385613	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB207147	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2005
AB211237	Coreia do Sul	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB477355	China	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB477354	China	<i>F. gigantica</i>	2009
AB385614	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2009
AB285612	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB207146	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB207144	Tailândia	<i>F. gigantica</i>	2009

AB207143	Indonésia	<i>F. gigantica</i>	2005
AB207142	Zâmbia	<i>F. gigantica</i>	2009
EF612469	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EF612468	Egipto	<i>F. hepatica</i>	2008
EF612467	Egipto	<i>F. hepatica</i>	2008
EF198867	Índia	<i>F. gigantica</i>	2007
AJ243016	América do Sul	<i>F. hepatica</i>	2002
AJ628432	China	<i>F. hepatica</i>	2007
AJ628431	China	<i>F. hepatica</i>	2007
JF824667	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
JF824666	Itália	<i>F. hepatica</i>	2011
EF612472	Quênia	<i>F. gigantica</i>	2008
EF612471	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2008
EF612470	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2008
AJ628430	China	<i>Fasciola spp.</i>	2007
AJ628429	China	<i>Fasciola spp.</i>	2007
AJ628428	China	<i>Fasciola spp.</i>	2007
AJ628427	China	<i>Fasciola spp.</i>	2007
AJ628426	China	<i>Fasciola spp.</i>	2007
AJ628425	China	<i>F. gigantica</i>	2007
AJ628043	China	<i>F. gigantica</i>	2007
AB536911	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
EF534991	USA	<i>Fascioloides magna</i>	2008
EF534990	USA	<i>Fascioloides magna</i>	2008
EF534988	República Checa	<i>Fascioloides magna</i>	2008

Código: códigos de identificação da sequência no “GeneBak”; Região geográfica: país onde o parasita foi encontrado; Parasita: Espécie do parasita e Ano de Publicação da sequência.

Tabela 20: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Fasc4.

Código	Região	Espécie	Ano de Publicação
EF0271003	Índia	<i>F. gigantica</i>	2008
JN585288	Turquia	<i>F. hepatica</i>	2012
AB553720	Egipto	<i>F. hepatica</i>	2011
AB553721	Egipto	<i>F. hepatica</i>	2011
FJ467927	Malásia	<i>F. hepatica</i>	2009
FJ593632	Turquia	<i>F. hepatica</i>	2009
FJ459806	Turquia	<i>F. hepatica</i>	2009
AB207150	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB207148	Austrália	<i>F. hepatica</i>	2009
AB010978	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB536917	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB553737	Egipto	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB010974	Uruguai	<i>F. hepatica</i>	2009
AB553738	Egipto	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536920	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB010975	Zâmbia	<i>F. gigantica</i>	2009
AB553695	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2011
AB553696	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2011
EU391424	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391423	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391422	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391421	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391420	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391419	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391418	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391417	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391416	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391415	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391414	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391413	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EU391412	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
DQ683546	Áustria	<i>F. hepatica</i>	2006
AB207153	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB553694	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2011
AB553698	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2011
JF496717	China	<i>F. hepatica</i>	2012
AB536921	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536928	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB536927	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB533626	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB533625	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB533624	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB533623	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB533622	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
AB533619	Vietnam	<i>Fasciola spp.</i>	2011
HQ199841	Irão	<i>F. hepatica</i>	2010
AB207152	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB010977	Indonésia	<i>F. gigantica</i>	2009
AB010976	Indonésia	<i>F. gigantica</i>	2009
JF432072	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
AB207151	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2009
AB010979	Japão	<i>Fasciola spp.</i>	2009
JF432071	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
DQ383512	Egipto	<i>F. gigantica</i>	2006
HQ700438	China	<i>F. gigantica</i>	2011
JF930346	Índia	<i>F. gigantica</i>	2011

JF432075	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
JF496709	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496714	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496710	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496712	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496711	China	<i>F. gigantica</i>	2012
JF496713	China	<i>F. gigantica</i>	2012
AM850107	Níger	<i>F. hepatica</i>	2009
AM900370	Níger	<i>F. hepatica</i>	2009
EU260073	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2008
EU260071	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2008
EU260068	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2008
EU260067	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2008
EU260066	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2008
EU260065	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2008
EU260064	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2008
EU260062	Vietnam	<i>F. gigantica</i>	2008
EU260058	Austrália	<i>F. hepatica</i>	2008
AM709648	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709647	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709646	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709645	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709644	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709643	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709619	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709618	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709616	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709615	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709614	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709613	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709612	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709611	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709610	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709609	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709499	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
AM709498	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2007
EF612481	Irão	<i>F. hepatica</i>	2008
EF612480	Egipto	<i>F. hepatica</i>	2008
EF612479	Egipto	<i>F. hepatica</i>	2008
AJ272053	Espanha	<i>F. hepatica</i>	2002
JF432078	Irão	<i>F. hepatica</i>	2011
EF534995	USA	<i>Fascioloides magna</i>	2008
EF534994	Canada	<i>Fascioloides magna</i>	2008
EF534993	R. checa	<i>Fascioloides magna</i>	2008

Código: códigos de identificação da sequência no “GeneBak”; Região geográfica: país onde o parasita foi encontrado; Parasita: Espécie do parasita e Ano de Publicação da sequência.

Tabela 21: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Dicro1.

Código	Região geográfica	Parasita	Ano de Publicação
JQ966973	Irão	D. dendriticum	2012
JQ966972	Irão	D. dendriticum	2012
EF547132	Itália	D. orientalis	2007
EF102025	Itália	D. hospes	2007
EF102024	Itália	D. hospes	2007
JF440765	USA	Alloglossidium fonti	2011
JF440764	USA	Alloglossidium fonti	2011
JF440763	USA	Alloglossidium fonti	2011
JF440766	USA	Alloglossidium fonti	2011
HQ680845	Austrália	Aptorchis sp.	2011
HQ680844	Austrália	Aptorchis sp	2011
HQ680843	Austrália	Aptorchis sp	2011
HQ680842	Austrália	Aptorchis sp	2011
HQ680841	Austrália	Aptorchis sp	2011
AM932523	Austrália	Aptorchis sp	2009
EU334369	Austrália	Aptorchis aequalis	2008
EU334368	Austrália	Aptorchis Sp.	2008
EF014730	Austrália	Aptorchis megacetabulus	2007
EF014729	Austrália	Aptorchis aequalis	2007

Código: códigos de identificação da sequência no “GeneBak”; Região geográfica: país onde o parasita foi encontrado; Parasita: Espécie do parasita e Ano de Publicação da sequência.

Tabela 22: Sequências obtidas por “BLAST”, utilizadas para gerar a rede filogenética de Eg1.

Código	Região geográfica	Parasita	Ano de Publicação
HM598451	Turquia	<i>E. granulosus</i>	2011
HM598452	Turquia	<i>E. granulosus</i>	2011
FN646371	Portugal	<i>E. granulosus</i>	2011
FN646369	Portugal	<i>E. granulosus</i>	2011
AB688621	Perú	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688617	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688616	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688614	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688611	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688610	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688609	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688608	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688607	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688603	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688602	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688598	Jordânia	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688597	Jordânia	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688596	Jordânia	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688594	Jordânia	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688591	Jordânia	<i>E. granulosus</i>	2012
Ab688590	Jordânia	<i>E. granulosus</i>	2012
AB688141	Rússia	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ317998	China	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ317997	China	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ317996	China	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ317995	China	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ317993	China	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ317991	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB650532	Etiópia	<i>E. granulosus</i>	2012
AB650530	Etiópia	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ250816	Irão	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ250815	Irão	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ250806	Irão	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ219963	Irão	<i>E. granulosus</i>	2012
JQ219964	Irão	<i>E. granulosus</i>	2012
JF906163	China	<i>E. granulosus</i>	2012
JF906160	China	<i>E. granulosus</i>	2012
JF906159	China	<i>E. granulosus</i>	2012
JF906158	China	<i>E. granulosus</i>	2012
JF906154	China	<i>E. granulosus</i>	2012
AB622277	Rússia	<i>E. granulosus</i>	2011
HM598459	Turquia	<i>E. granulosus</i>	2011
HM598457	Turquia	<i>E. granulosus</i>	2011
HM598454	Turquia	<i>E. granulosus</i>	2011
AB491445	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491442	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491440	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491438	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491435	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491433	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491429	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491428	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491427	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491426	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491425	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491424	China	<i>E. granulosus</i>	2010

AB491422	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491419	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491417	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491416	China	<i>E. granulosus</i>	2010
AB491414	China	<i>E. granulosus</i>	2010
GQ856693	Irão	<i>E. granulosus</i>	2009
AB458675	Peru	<i>E. granulosus</i>	2009
AB458673	Peru	<i>E. granulosus</i>	2009
AB458672	Peru	<i>E. granulosus</i>	2009
EU178104	Turquia	<i>E. granulosus</i>	2008
EU178103	Turquia	<i>E. granulosus</i>	2008
EF595654	Turquia	<i>E. granulosus</i>	2008
EF393619	Turquia	<i>E. granulosus</i>	2008
EF367277	Marrocos	<i>E. granulosus</i>	2007
EF367276	Marrocos	<i>E. granulosus</i>	2007
EF367275	Marrocos	<i>E. granulosus</i>	2007
EF367274	Marrocos	<i>E. granulosus</i>	2007
EF367273	Marrocos	<i>E. granulosus</i>	2007
EF367272	Marrocos	<i>E. granulosus</i>	2007
EF367271	Marrocos	<i>E. granulosus</i>	2007
EF367270	Marrocos	<i>E. granulosus</i>	2007
EF367269	Marrocos	<i>E. granulosus</i>	2007
HQ204206	China	<i>Taenia hidatigena</i>	2010

Código: códigos de identificação da sequência no “GeneBak”; Região geográfica: país onde o parasita foi encontrado; Parasita: Espécie do parasita e Ano de Publicação da sequência.