



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO DE PARASITAS GASTRINTESTINAIS, PULMONARES,  
CUTÂNEOS E MUSCULARES EM CANÍDEOS DOMÉSTICOS E  
SILVESTRES NO NORTE DE PORTUGAL

MARTA SOFIA SOUSA DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JURI

Professor Doutor José Augusto Farraia  
e Silva Meireles

Professor Doutor Luís Manuel Madeira  
de Carvalho

Professora Doutora Ana Isabel Simões  
Pereira Duarte

Dr. Nuno Gonçalo Carvalho Carço  
dos Santos

ORIENTADOR

Dr. Nuno Gonçalo Carvalho Carço dos  
Santos

CO-ORIENTADOR

Professor Doutor Luís Manuel Madeira  
de Carvalho

2010

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

Será muito difícil por palavras escritas, expressar o meu reconhecimento e todo o meu fascínio por aqueles que me ajudaram.

Passo a agradecer muito ao Dr. Nuno Santos, Veterinário do PNPG, por ter aceite ser o meu orientador de estágio, pelo seu convívio, pelos seus conhecimentos, optimismo, pelas fotografias, material de estudo e pesquisas gentilmente cedidas e que deram corpo a este trabalho.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, da secção de Parasitologia e Patologia e Clínica das Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (SEPAR/FMV/UTL), por ter aceite ser o meu co-orientador de estágio, por todo o apoio prático em laboratório, material cedido, pelos seus ensinamentos e pela sua crescente e invariável boa disposição.

Ao Parque Nacional da Peneda Gerês, pelo alojamento e apoio dos tratadores, Francisco Neto e António Rebelo, pelos maravilhosos conhecimentos que só eles sabem transmitir, pela amabilidade com que me receberam e na ajuda da recolha de amostras para a realização deste trabalho.

Às biólogas da VERANDA, Helena Rio-Maior e Mónia Nakamura, pela incansável ajuda e oportunidade magnífica em participar nas suas actividades, pelos ensinamentos sobre o lobo-ibérico e na orientação da recolha das amostras, sem a qual não seria possível a execução deste estudo. E também à VERANDA – Associação para o Estudo e Conservação do Património de Montanha, pelo alojamento em Castro Laboreiro.

À bióloga Sara Roque do Grupo Lobo e ao Dr. Ricardo Brandão pela ajuda na recolha de amostras.

Ao CIBIO-UP (Dr. Francisco Álvares) pelo apoio no trabalho de campo e financiamento de alguns testes sorológicos.

À Professora Doutora Isabel Fonseca (SEPAR/FMV/UTL), pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos aquando na análise das minhas amostras.

Ao Dr. Rafael Calero Bernal pela transmissão dos seus conhecimentos sobre a *Trichinella*, pela disponibilidade e por todas as informações cedidas sobre o mesmo assunto.

Ao CEVDI pela oportunidade de estágio nas suas instalações.

À Inês Bravo pela amizade, imensa ajuda, companhia e concretização dos resultados em laboratório.

À Lídia Nabais, técnica do laboratório de Parasitologia e Patologia das Doenças Parasitárias da FMV, por toda a amabilidade com que fui recebida, pela enorme disponibilidade, ajuda incansável, paciência e boa disposição.

À Rita Gordo por todos os anos em que me acompanhou, pelas noitadas de estudo, pelo seu empenho e preocupação pela minha vida académica e pelo meu bem-estar pessoal. Mais ainda lhe agradeço o facto de ser minha amiga e o grande contributo que deu à minha vida.

Aos meus companheiros de curso e de laboratório, José Cardoso e André Batista, pela extrema boa disposição e por me terem ajudado a passar no melhor ambiente possível uma fase importante do meu estudo e na qual também participaram.

Aos meus amigos, João Lopes, Joana Almeida, Carlota, Rita, Vasco, Rui e André, inesquecíveis que me acompanharam durante o meu percurso da vida académica, pela paciência, e acima de tudo amizade.

Agradeço ainda a tantos outros amigos a quem, por este meio, presto a minha homenagem.

E por último, uns agradecimentos especiais aos meus pais e irmão que sempre foram buscar forças para me ajudarem nos mais variados quadrantes que a vida conhece e por me ensinarem a conhecer melhor o mundo.



## Resumo

Esta dissertação é resultado de um estágio composto por duas partes bem distintas, a primeira, realizada no Parque Nacional da Peneda Gerês e a segunda no laboratório de Doenças parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. A primeira parte constou essencialmente num trabalho de campo, com a recolha de fezes de canídeos silvestres e domésticos e de outras amostras biológicas, como a pele e tecido muscular, através da realização de necrópsias; para o estudo do respectivo rastreio de parasitas gastrintestinais, pulmonares, sarna e *Trichinella sp.* Na segunda parte realizou-se a identificação dos diferentes parasitas, através de análises coprológicas, de digestão artificial da pele e do tecido muscular.

Para o rastreio dos parasitas gastrintestinais foram colhidas 284 amostras de fezes provenientes de 9 alcateias da região Norte de Portugal e de acordo com as três espécies de canídeos em estudo: lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*), raposa-vermelha (*Vulpes vulpes silacea*) e cão doméstico (*Canis lupus familiaris*). Posteriormente, estas amostras foram divididas pelas diferentes alcateias e espécies animais: lobo-ibérico n=164, raposa n=81 e o cão n=39. No total das 284 amostras, 72,9 % (n=208) encontravam-se parasitadas. No caso da sarna analisaram-se 8 amostras das quais 4 eram de lobo e 4 de raposa, em que os resultados são positivos para a sarna sarcóptica, com maior grau de infecção para a raposa. Quanto à análise do tecido muscular, em 22 amostras totais (10 de lobo e 12 de raposa), 9,1% (n=2) apresentaram-se infectadas por *Trichinella*, exclusivamente na raposa.

O presente estudo apresenta uma análise de parasitofauna em canídeos domésticos e silvestres com o intuito de testar a existência de diferenças significativas, tendo em conta a ecologia (densidade populacional), a dieta dos diferentes canídeos silvestres *versus* domésticos, que frequentam os mesmos ecossistemas, e ainda, a biologia dos próprios parasitas. Deste modo, contribuindo para aumentar a informação sobre a parasitofauna nos canídeos silvestres e o impacto epidemiológico que implica a circulação destes mesmos animais, cada vez mais perto dos domésticos e do homem.

**Palavras-chave:** *Canis lupus signatus*, *Vulpes vulpes silacea*, *Canis lupus familiaris*, parasitas gastrintestinais, sarna, *Trichinella*, alcateias, Norte de Portugal.

## **Abstract**

This dissertation is a result of an internship composed of two distinct parts. The first part took place in the Peneda Gêres National Park and the second part took place in the Parasitic Disease Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine at the Universidade Técnica of Lisbon. The first part essentially comprised of the following, collecting fecal samples of wild and domestic canids and other biological specimens such as skin and muscle tissue collected after performing necropsies, for the study and research of gastrointestinal and lung parasites, mange and *Trichinella sp.* The second part achieved the identification of different parasites through coprological analysis, artificial skin and muscle tissue digestion.

For the research of gastrointestinal parasites, 284 feces samples were collected from 9 different packs from the northern region of Portugal and comprising of three distinct species of canids in the study: iberian wolf (*Canis lupus signatus*), red fox (*Vulpes vulpes silacea*) and domestic dog (*Canis lupus familiaris*). Next the samples were divided by the different packs and animal species: iberian wolf n=164, red fox n =81, Dog n=39. Of the total of 284 samples, 73,24% (n=208) were found positive at least one Gastrointestinal parasite. In the case of mange 8 samples were analysed, 4 from wolf and the others from red fox. All were positive for sarcoptic mange, with the highest degree of infection in the red fox. In the muscle tissue analysis, 22 samples were taken, of which 10 from wolf and 12 from fox. 9, 1% (n=2) showed positive to *Trichinella* and these samples were mainly in the fox.

These study presents an analysis of parasitic fauna in domestic and wild canids aiming the significant differences between them, taking into consideration the ecology (population density), the diet of different wild canids versus domestic canids that frequent the same ecosystems and the parasites biology. Therefore it is aim an increase of information concerning the parasitic fauna in the wild canids and the epidemiological impact associated with the movement of these animals, each time closer to domestic animals and man.

**Key words:** *Canis lupus signatus*, *Vulpes vulpes silacea*, *Canis lupus familiaris*, gastrointestinal parasites, mange, pack of wolves, Northern Portugal.

# Índice

Agradecimentos .....	I
Resumo.....	IV
Abstract .....	V
Índice de Figuras .....	VII
Índice de Tabelas .....	VIII
Índice de Gráficos .....	IX
Abreviaturas .....	X
Lista de símbolos .....	X
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1. Apresentação do estágio e do trabalho: .....	1
1.2. Objectivos do trabalho:.....	2
Capítulo 2 – Casuística e actividades desenvolvidas no estágio.....	3
2.1. Parque Nacional da Peneda Gerês .....	3
2.2. Casuística.....	3
Capítulo 3 - Revisão Bibliográfica.....	8
3.1. Parasitas Gastrintestinais .....	8
3.2. Parasitas Pulmonares .....	49
3.3. Parasitas Musculares .....	53
3.4. Parasitas da Pele .....	61
Capítulo 4 – Materiais e métodos .....	66
4.1. Caracterização das espécies animais (hospedeiros) em estudo .....	66
4.2. Metodologia de selecção e caracterização das áreas de estudo .....	70
4.3. Técnicas de amostragem, colheita e preparação das amostras .....	73
4.4. Métodos/ Técnicas de laboratório.....	74
4.5. Análise estatística .....	81
Capítulo 5 – Resultados .....	83
5.1. Parasitas Gastrintestinais e Pulmonares .....	83
5.2. Parasitas Musculares .....	95
5.3. Parasitas da Pele .....	97
Capítulo 6 – Discussão.....	99
Capítulo 7 - Conclusões .....	108
Capítulo 8 - Referências Bibliográficas .....	111
Anexos.....	117

## Índice de Figuras

<b>Fig. 1:</b> a) Mapa que representa a área de estudo; b) Mapa de Portugal com os pontos de GPS que identificam a área de estudo.....	71
<b>Fig. 2:</b> Mapa com os pontos de GPS por alcateias, a norte do rio Douro pertencentes ao núcleo populacional da Peneda/Gerês.....	72
<b>Fig. 3:</b> Mapa com os pontos por espécie de canídeo em estudo.....	72
<b>Figs 4, 5 e 6:</b> Recolha de amostras em campo .....	73
<b>Fig. 7:</b> Câmaras de McMaster .....	75
<b>Fig. 8:</b> Técnica de Willis .....	76
<b>Fig. 9:</b> Técnica de Sedimentação Natural (original) .....	76
<b>Fig. 10:</b> Lâminas de esfregaços fecais coradas pelo método de Ziehl-Neelsen modificado (Original) .....	77
<b>Fig. 11:</b> Lâmina com as amostras e controlo positivo.....	78
<b>Fig. 12:</b> Erlenmeyer de 500 ml com a solução: água, pepsina, ácido clorídrico e amostra de músculo triturado, sobre o agitador magnético.....	80
<b>Fig. 13:</b> Ampola de decantação.....	80
<b>Fig. 14:</b> Ovo de <i>Toxocara canis</i> (ocular 10X e objectiva 10X) (Fonte: Original) .....	92
<b>Fig. 15:</b> Ovo de <i>Strongyloides</i> (ocular 10X e objectiva 10X) (Fonte: Original) .....	92
<b>Fig. 16:</b> Ovo de <i>Ancilostomídeo</i> (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original) .....	92
<b>Figs. 17 e 18:</b> Oncosferas de parasitas da família <i>Taeniidae</i> (ocular 10x e objectiva 20x). a) Técnica de willis e b) Técnica de sedimentação natural (Fonte: Original) .....	92
<b>Fig. 19:</b> Ovo de <i>Trichuris</i> spp (ocular 10x e objective 20x) (Fonte: Original) .....	92
<b>Fig. 20:</b> Ovo de <i>Capillaria</i> (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original) .....	92
<b>Fig. 21:</b> Ovo de <i>Nematodirus</i> (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original) .....	92
<b>Fig. 22:</b> Ovo de <i>T. leonina</i> (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original) .....	92
<b>Fig. 23:</b> Ovo de <i>Paranoplocephala</i> (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original) .....	93
<b>Fig. 24:</b> Ovo de <i>Moniezia</i> (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original).....	93
<b>Fig. 25:</b> Oocisto de <i>Cystoisospora</i> (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original).....	93

<b>Fig. 26:</b> Esporocisto de <i>Sarcocystis</i> (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original).....	93
<b>Fig. 27:</b> Oocisto de <i>Eimeria</i> (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original).....	93
<b>Fig. 28:</b> Infecção mista – ovos de <i>Moniezia</i> e ancilostomídeos e oocistos de coccídeos (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original).....	93
<b>Figs. 29 e 30:</b> Oocistos de <i>C. parvum</i> corados por Ziehl-Neelsen (ocular 10 X e objectiva 100 X (imersão)) (Fonte: Original).....	94
<b>Fig. 31 e 32:</b> Aspecto dos oocistos visualizados em imunofluorescência directa, após coloração com anticorpos monoclonais marcados (ocular 10 X e objectiva 40 X) (Fonte: Original).....	94
<b>Fig. 33 e 34:</b> Larvas de <i>Trichinella</i> sp. colhidas em raposas. Ampliação de 10x (Fonte: original).....	96
<b>Figs. 35 e 36:</b> Raposas com sarna sarcóptica a) Juvenil e b) Adulto (Fonte: Nuno Santos).....	97
<b>Figs. 37:</b> <i>Sarcoptes scabiei</i> de amostras de pele de <i>Vulpes vulpes</i> : a) Ocular 10 x e objectiva 10 x; b) e c) Ocular 10 x e objectiva 40 x. (Fonte: Nuno Santos) .....	97
<b>Figs. 38:</b> a) Cadáver de <i>Canis lupus</i> com sarna Sarcóptica, b) <i>Sarcoptes scabiei</i> de amostras de pele de <i>Canis lupus</i> , ocular 10 x e objectiva 10 x (Fonte: Nuno Santos).....	97

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Correspondência das diferentes espécies e genótipos de Triquinela com as respectivas localizações e hospedeiros (Gottstein et al., 2009).....	53
<b>Tabela 2:</b> Correspondência dos diferentes estados morfológicos da <i>Trichinella</i> sp com a sua localização no ciclo biológico (Martinez-Fernandez, 1999) .....	54
<b>Tabela 3:</b> Principais características zoonóticas das espécies e genótipos da <i>Trichinella</i> Gottstein et al., 2009) .....	60
<b>Tabela 4:</b> Prevalências de parasitas no lobo-ibérico ( <i>Canis lupus signatus</i> ), raposa ( <i>Vulpes vulpes silacea</i> ) e cão ( <i>Canis familiaris</i> ), no total das amostras .....	83
<b>Tabela 5:</b> Taxa de prevalência de helmintes e coccídeos no lobo-ibérico ( <i>Canis lupus signatus</i> ) nas diferentes alcateias.....	86
<b>Tabela 6:</b> Intensidades médias de infecção dos diferentes parasitas e amplitude de excreção parasitária no lobo-ibérico, expressas em número de ovos por grama de fezes (opg) .....	88

<b>Tabela 7:</b> Intensidades médias de infecção dos diferentes parasitas e amplitude de excreção parasitária na raposa, expressas em número de ovos por grama de fezes (opg).....	88
<b>Tabela 8:</b> Intensidades médias de infestação dos diferentes parasitas e amplitude de excreção parasitária no cão, expressas em número de ovos por grama de fezes (opg).....	88
<b>Tabela 9:</b> Intensidades médias de infecção por <i>Strongyloides</i> e amplitude de excreção parasitária por alcateia, expressa em número de ovos por grama de fezes (opg).....	89
<b>Tabela 10:</b> Intensidades médias de infecção por <i>Ancylostoma/Uncinaria</i> e amplitude de excreção parasitária por alcateia, expressa em número de ovos por grama de fezes (opg).....	90
<b>Tabela 11:</b> Intensidades médias de infecção por <i>T. canis</i> e amplitude de excreção parasitária por alcateia, expressa em número de ovos por grama de fezes (opg).....	90
<b>Tabela 12:</b> Intensidades médias de infecção por <i>T.leonina</i> e amplitude de excreção parasitária por alcateia, expressa em número de ovos por grama de fezes (opg).....	91
<b>Tabela 13:</b> Resultados para a pesquisa de <i>Trichinella</i> das amostras de músculo analisadas.....	95
<b>Tabela 14:</b> Resultados da pesquisa de ácaros do género <i>Sarcoptes</i> das amostras de pele analisadas em raposa e lobo.....	96

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1:</b> Frequência relativa das espécies acompanhadas e observadas.....	4
<b>Gráfico 2:</b> Frequência relativa dos grupos de espécies .....	5
<b>Gráfico 3:</b> Distribuição das categorias dos casos acompanhados.....	6
<b>Gráfico 4:</b> Distribuição das categorias dos casos acompanhados.....	6
<b>Gráfico 5:</b> Gráfico das prevalências globais dos parasitas assinalados nas três espécies de canídeos.....	83
<b>Gráfico 6:</b> Gráfico das prevalências do número de amostras positivas para cada uma das espécies de canídeos em estudo.....	84
<b>Gráfico 7:</b> Distribuição das prevalências dos parasitas por cada espécie de canídeo.....	85
<b>Gráfico 8:</b> Distribuição da média das taxas de prevalência dos parasitas de <i>C. lupus</i> a norte e a sul do rio Douro.....	87

## Abreviaturas

**CEVDI** – Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas

**CIBIO-UP** – Centro de Investigação em Biodiversidade – Universidade do Porto

**CRFS-PNPG** – Centro de Recuperação de Fauna Selvagem – Parque Nacional da Peneda Gerês.

**ELISA** - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

**ICNB** – Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade

**FMV** – Faculdade de Medicina Veterinária

**OIE** – World Organization for Animal Health

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OPG** – ovos por grama

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction*

**SEPNA** – Serviço de Protecção da Natureza e do Ambiente

## Lista de símbolos

% - percentagem

°C – grau Célsius

µm – micrómetro

g - grama

mm – milímetro

**NaOH** – Hidróxido de Sódio

**ZnSO<sub>4</sub>** – Sulfato de Zinco

**mL** – mililitro

# Capítulo 1 – Introdução

## 1.1. Apresentação do estágio e do trabalho:

Esta dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária é o resultado de um estágio curricular efectuado no Parque Nacional da Peneda Gerês (PNPG) entre os dias 6 de Outubro e 20 de Dezembro de 2008, sob orientação do Dr. Nuno Carçoço dos Santos.

Este estágio permitiu a aquisição de aptidões práticas e o reforço de alguns conhecimentos técnico-científicos adquiridos durante todo o curso, mas essencialmente o desenvolvimento de capacidades fundamentais desta prática veterinária pouco explorada ao longo da minha formação académica.

Deste modo, no capítulo inicial deste trabalho irá ser apresentada uma descrição das actividades desenvolvidas e acompanhadas durante o estágio. Assim como, todo o processo de investigação desenvolvido, tratamentos das amostras e outras actividades que apenas nomeadas, não irão ser desenvolvidas por não constituírem elementos de discussão e conclusão deste trabalho.

Posteriormente será, então, apresentado o estudo efectuado com as amostras colhidas, no âmbito da sanidade animal em carnívoros silvestres, com o objectivo de apresentar a prevalência de parasitas nas amostras referidas no qual se destacam razões de importância primordiais, na medida em que permite obter o conhecimento dos parasitas destas espécies referidas, a sua distribuição geográfica, as relações parasita-hospedeiro e as suas consequências nas populações. Acrescento ainda, o contributo para compreender melhor a origem das infecções parasitárias e a relevância no que diz respeito à saúde pública, uma vez que os animais silvestres podem agir como um reservatório, vector ou simplesmente como vítimas de doenças transmissíveis ao homem ou animais domésticos, contribuindo para a disseminação de zoonoses. Também é importante salientar o estudo destes parasitas como indicadores-biológicos dos seus hospedeiros (indicadores taxonómicos, etiológicos e geográficos) (Carvalho-Varela, 1988/1989). Na Europa, isto tem-se registado com o caso da raiva, quando o cão, classificado como principal reservatório, foi posteriormente substituído pela raposa vermelha (*Vulpes vulpes*); com a tuberculose bovina através do texugo euroasiático (*Meles meles*), situação observada pela primeira vez em 1971 (Muirhead, Gallagher & Burn, 1974) e mais recentemente, com o javali (*Sus scrofa ferus*) na peste suína clássica (PSC), tornando-se mais frequente a transferência entre animais domésticos e silvestres (Aubert, 1994).

Actualmente, os carnívoros silvestres representam importantes reservatórios de parasitas zoonóticos, entre os quais destacamos os helmintes, pelo que devem ser realizados estudos de prevalência tendo em vista o estabelecimento de medidas de controlo e profilaxia.

A maior parte dos dados helmintológicos publicados provêm de observações *post-mortem*, em menor frequência com base na coprologia e raramente nos que se baseiam na combinação de ambos os métodos. Em qualquer dos casos, todos representam uma fonte útil e credível de informação (Domínguez et al., 2002).

O presente trabalho foi realizado recorrendo à análise laboratorial de amostras fecais de lobo-Ibérico, raposa-vermelha e cão em zonas de pastoreio e de caça. Apesar de apresentar algumas vantagens, também serão referenciados alguns inconvenientes relativamente a trabalhos baseados em necrópsias. No entanto, o pequeno número de animais mortos, em boas condições de conservação, que foram possíveis necropsiar para fazer uma comparação das duas técnicas, não constituíram uma amostra representativa das populações em estudo, sendo apenas referidos. Além das amostras fecais também se recorreu à análise de tecido muscular e de pele, para efectuar um rastreio e concluir sobre os tipos de parasitas existentes nestes tecidos.

## **1.2. Objectivos do trabalho:**

Neste estudo abordar-se-á a importância do estudo da parasitofauna dos canídeos silvestres e domésticos na área Norte de Portugal, com base no seu ciclo-biológico, nos diferentes tipos de hospedeiro, na epidemiologia, sintomas/patogenia, diagnóstico e aspectos zoonóticos.

Baseado no estudo das amostras fecais, cadáveres, amostras de pele e músculos, foram analisadas várias populações de canídeos silvestres do Norte de Portugal para avaliar o seu estatuto parasitológico.

## **Capítulo 2 – Casuística e actividades desenvolvidas no estágio**

### **2.1. Parque Nacional da Peneda Gerês**

O Parque Nacional da Peneda-Gerês (PNPG) localiza-se na região Norte de Portugal (Minho-Lima, Cávado, Alto Trás-os-Montes) abrangendo os concelhos de Arcos de Valdevez, Montalegre, Ponte da Barca, Terras de Bouro e Melgaço, totalizando uma área de 70 290 ha. O P.N.P.G. é a única área protegida em Portugal que possui a categoria de Parque Nacional, o nível mais elevado de classificação das áreas protegidas.

"Ao criar-se o primeiro parque nacional no continente, procura-se possibilitar no meio ambiente da Peneda-Gêres a realização de um planeamento científico a longo prazo, valorizando o homem e os recursos naturais existentes, tendo em vista finalidades educativas, turísticas e científicas.

Numa síntese da ética de protecção, trata-se de possibilitar uma vasta região montanhosa de cerca de 60 000 ha - quase na totalidade já submetidos no regime florestal, a conservação do solo, da água, da flora, da fauna e da paisagem, abrindo-a às vastas possibilidades do turismo, mas mantendo uma rede de reservas ecológicas de alto interesse científico, tanto nacional como internacional". (D.L. 187/71 de 8 de Maio).

A área de clínica veterinária para a recuperação das espécies está a cargo do Dr. Nuno Santos, sendo auxiliado por uma equipa de técnicos e auxiliares, que diariamente levam a cargo um trabalho de assistência e recuperação da fauna que habita a extensa área que constitui o PNPG.

### **2.2. Casuística**

O meu estágio no Centro de Recuperação de Fauna Selvagem do Parque Nacional da Peneda-Gerês (CRFS-PNPG) durante o período de Outubro até Dezembro de 2008, constou em trabalhos de diversas áreas. Além do acompanhamento do trabalho no centro de recuperação com o Dr. Nuno Santos, também realizei trabalho de campo com todo o apoio e orientação de duas biólogas, envolvidas num projecto de estudo de lobos-ibéricos no Gerês, e ainda uma parte de laboratório para o respectivo tratamento e análise das amostras colhidas durante o trabalho de campo. Estas amostras constituíram o meu principal material de estudo, acrescentando ainda o material colhido nas necrópsias e que culminou num estudo na área da sanidade animal em carnívoros silvestres – lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*), raposa (*Vulpes vulpes silacea*) e cão (*Canis lupus familiaris*), este último para análise comparativa entre canídeos silvestres *versus* domésticos.

Depois de enunciadas passo a descrever, detalhadamente, as actividades realizadas:

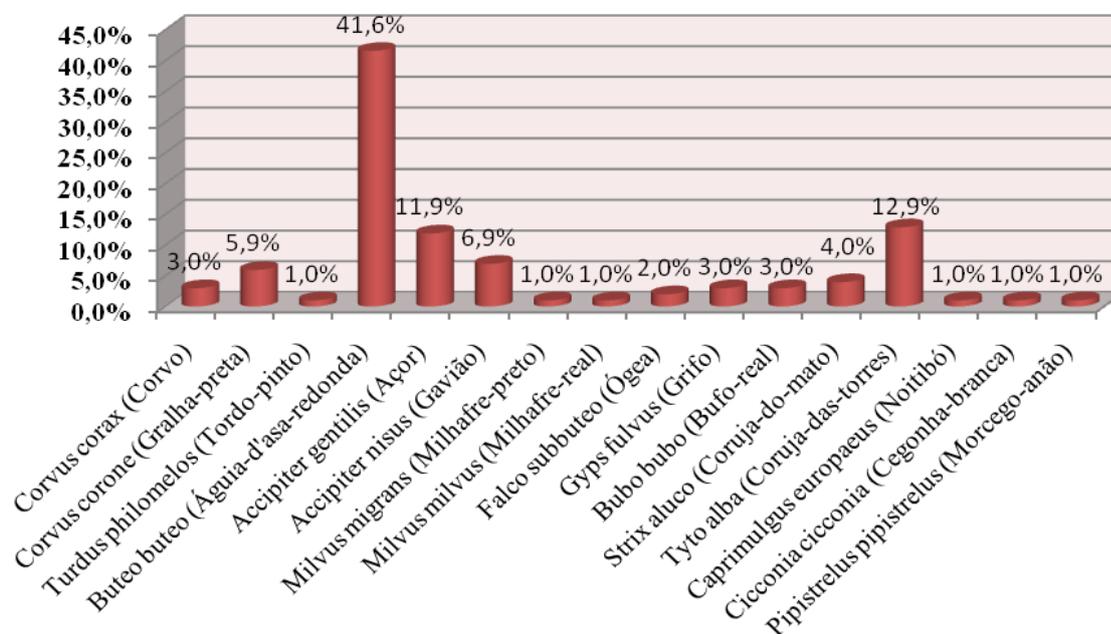
### 2.2.1. Estágio no CENTRO DE RECUPERAÇÃO DE FAUNA SELVAGEM - PARQUE NACIONAL DA PENEDA-GERÊS

No centro tive a oportunidade de acompanhar todo o trabalho de rotina. Deste modo, foi possível fazer as seguintes actividades: clínica, cirurgia e gestão do centro de recuperação, sobretudo em aves; apoio ao sistema de indemnização por prejuízos de lobos com tratamentos de animais feridos e necrópsias para recolha de material para o banco de tecidos, para posterior realização de trabalhos de estudos em animais selvagens.

#### - Área de clínica

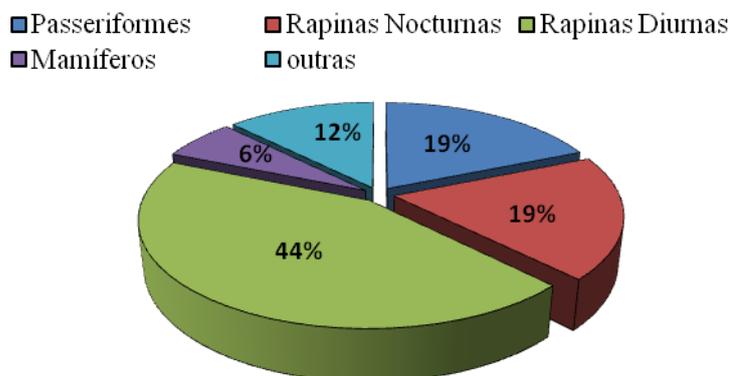
Na área de clínica, durante o estágio tive contacto e conhecimento de casos de um total de 101 animais (Gráfico 1), e segundo o relatório anual de 2008 do CRFS-PNPG houve um total de 249 animais de 44 espécies que passaram no centro ao longo do ano 2008, o que “correspondeu ao segundo valor anual de admissões mais elevado desde o início da sua actividade, em 1987”.

**Gráfico 1:** Frequência relativa das espécies acompanhadas e observadas



A Classe mais representada foi a das aves, principalmente as aves de rapina diurnas (44%), seguindo as aves de rapina nocturnas (19%), passeriformes (19%) e outras (12%). No que diz respeito a mamíferos foi só um caso de um morcego (6%) (Gráfico 2).

**Gráfico 2:** Frequência relativa dos grupos de espécies



Os animais que dão entrada no CRFS-PNPG, e para os quais é possível obter informação, são recolhidos principalmente por particulares, pelo SEPNA e outras forças policiais, outros centros de recuperação e outros, como sejam Áreas Protegidas, autarquias, bombeiros e empresas.

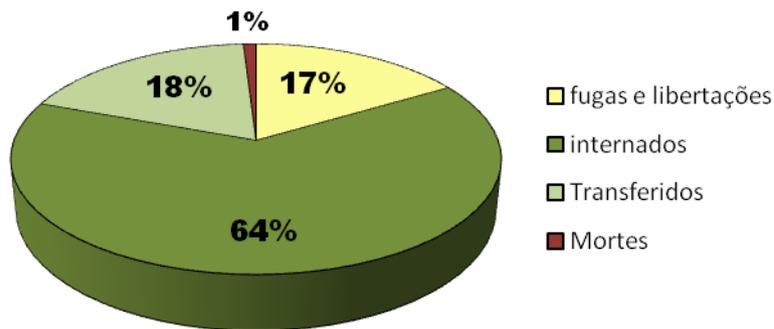
As principais ameaças para os animais e que constituem as causas principais de ingresso no centro de recuperação foram:

- Perda / Fragmentação do habitat;
- Pilhagem de ninhos;
- Queda de ninho;
- Abate ilegal;
- Atropelamento e colisão com veículos;
- Perda de locais de nidificação;
- Envenenamento por pesticidas;
- Electrocussão;
- Colisão com automóveis, linhas eléctricas e arame farpado
- Predação

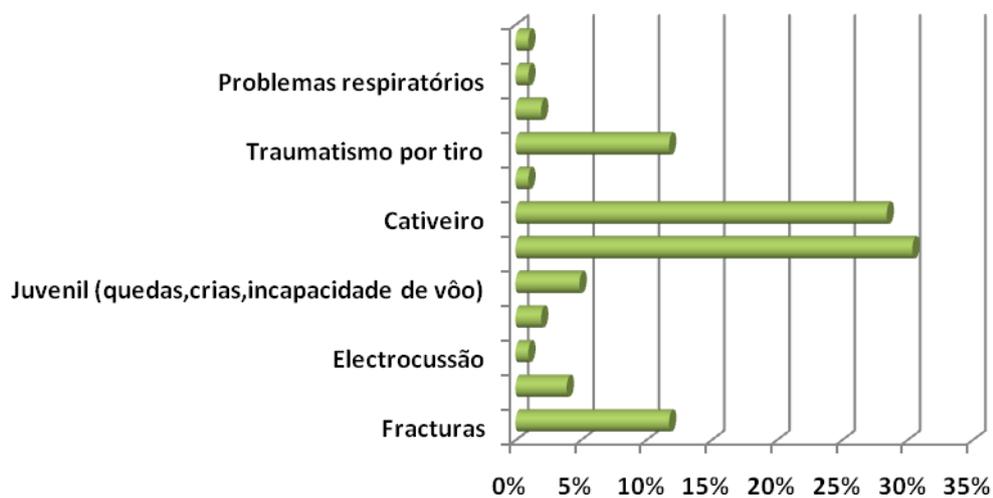
Durante o estágio, a principal causa de ingresso foi a inanição (30,39%), em que os animais se encontravam extremamente enfraquecidos, por falta de alimentos, por defeito de assimilação dos mesmos, o que consequentemente levava à perda de condição física e mau estado da plumagem. As outras causas foram o cativeiro ilegal (28,43%), os traumatismos (83,33%), dos quais os principais foram por colisão com carros, janelas e aerogeradores (3,92%), tiro (11,76%), por

atropelamento (1,96%) e entre outros. Ainda, se registaram casos de electrocussão (0,98%), fracturas (11,76%), juvenis (quedas, crias, incapacidade de vôo) (4,90%) e outras (Gráfico 4). Para melhor exposição dos casos que constituíram o meu trabalho durante o estágio, foram divididos os casos nas seguintes categorias:

**Gráfico 3:** Distribuição das categorias dos casos acompanhados



**Gráfico 4:** Distribuição das categorias dos casos acompanhados



#### - Realização de necrópsias

Nas necrópsias efectuaram-se colheitas de material biológico: helmintes adultos no tubo digestivo, coração e vasos, colheita de sangue para esfregaços e obtenção de soro, para complementar os estudos efectuados no estágio e para constituição de uma base de dados de gestão e transferência de informação e amostras tratadas através de parcerias científicas.

### **- *Trichomonas* em pombos**

Nesta área realizou-se o rastreio de tricomonose em pombais tradicionais do Douro Internacional. Este trabalho constou da visita a estes pombais no âmbito do controlo epidemiológico das Águias de Bonelli, uma vez os pombos destes pombais constituem uma das suas principais fonte de alimentação.

As *Trichomonas sp* são protozoários flagelados monocelulares e móveis. Quase todos os pombos são portadores de *Trichomonas*, que vivem nas mucosas do bico e da garganta, no esófago e no papo. Os pombos infectados expõem os parasitas na saliva e nas fezes. Os pombos adultos infectam os borrachos quando os alimentam.

O diagnóstico constou no exame microscópico de amostras de secreção da mucosa da faringe e do papo de pombos vivos, recolhidas com uma zaragatoa, após incubação por 6 dias a 36°C em meio de cultura.

### **- Trabalho de campo / recolha de amostras:**

Colheita de 15-30 dejectos/alcateia, em 4 alcateias cujas amostras fecais foram colhidas em transectos conjuntos com duas biólogas que estão envolvidas num projecto de estudo de lobos-ibéricos no Alto Minho. Nas outras 5 alcateias, as fezes foram recolhidas com ajuda dos guardas em transectos dirigidos para o efeito e que também fazem parte do plano de vigilância do parque.

No total foram recolhidas cerca de 300 amostras fecais.

## **2.2.2. Trabalho laboratorial**

### **2.2.2.1 Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) – Laboratório de Doenças Parasitárias**

Nesta fase do trabalho procedeu-se à análise das amostras fecais colhidas durante todo o tempo de estágio. Nestas análises aplicaram-se os métodos coprológicos de flutuação e sedimentação para identificação de ovos, bem como a quantificação de ovos por grama de fezes (opg) pelo método de McMaster.

### **2.2.2.2. Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas (CEVDI)**

Esta parte constou de um rastreio de agentes infecciosos em carnívoros silvestres, sendo efectuada a colheita de amostras (exsudado pulmonar e soro) em necrópsias (cerca de 90 amostras de lobo e raposa) para rastreio sorológico de outros agentes que não foram incluídos neste trabalho.

## Capítulo 3 - Revisão Bibliográfica

### 3.1. Parasitas Gastrintestinais

#### 3.1.1. Nemátodes

Os canídeos podem ser parasitados por diversas espécies de nemátodes intestinais, registrando-se uma grande diversidade, no que diz respeito aos ciclos biológicos, epidemiologia, acções patológicas e importância em termos de Saúde Pública. Os que apresentam maior frequência e consequentemente, maior perigo no nosso país são:

- *Toxocara canis* (Werner, 1782);
- *Toxascaris leonina* (Von Linstow, 1902);
- *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1856);
- *Uncinaria stenocephala* (Railliet, 1884);
- *Strongyloides stercoralis* (Babay, 1876);
- *Eucoleus aerophilus* (Creplin, 1839);
- *Trichinella sp.* (Railliet, 1895);
- *Trichuris vulpis* (Froelich, 1789).

##### 3.1.1.1. Ascarídeos

Os ascarídeos dos carnívoros possuem uma distribuição mundial e encontram-se entre os endoparasitas mais frequentes deste tipo de hospedeiros. São nemátodes da ordem *Ascaridia*, superfamília *Ascaridoidea* e família *Ascarididae*; estão entre os maiores nematóides, de cor esbranquiçada opaca e cuja cutícula possui finas estrias transversais. A boca consiste numa pequena abertura circundada de três lábios e, lateralmente, este parasita possui duas asas cervicais. O extremo posterior é rombo nas fêmeas e digitiforme nos machos com espículas desenvolvidas. Uma característica importante deste grupo reside nas consequências patológicas do comportamento migratório dos estádios larvares (Urquhart et al., 1996).

O modo comum de infecção é por ingestão do ovo de casca espessa contendo a L<sub>3</sub>. Entretanto o ciclo pode envolver hospedeiros intermediários e paraténicos (Urquhart et al., 1996).

Do género *Toxocara*, a espécie de parasita dos carnívoros domésticos e silvestres por excelência, como o próprio nome indica, é o *Toxocara canis*, contudo, também está citada a sua existência na Península Ibérica em raposa, lobo, lince e gato selvagem. A outra espécie também típica dos cães é a *Toxascaris leonina*, é o menos frequente e pode afectar, indistintamente, canídeos e felídeos domésticos e silvestres (Baños et al., 1999).

### 3.1.1.1.1 *Toxocara canis*

Nestes animais a espécie corresponde à *Toxocara canis*, como já foi referido. Esta mesma é responsável pela forma mais amplamente identificada de larva *migrans* visceral no Homem (Urquhart et al., 1996).

*Toxocara canis* é um parasita gastrointestinal cosmopolita dos canídeos, e apresenta um vasto número de hospedeiros paraténicos, entre mamíferos e aves, onde o parasita em fase larvar, migra através de vários tecidos e tem a capacidade de sobreviver por um longo período de tempo (Taira et al., 2004). É, portanto um género constituído por grandes ascarídeos, cujos adultos constituem parasitas do intestino delgado de vários mamíferos. A boca apresenta três grandes lábios e bulbo esofágico glandular (o ventrículo), localizado na junção do esófago e intestino (Bowman et al., 2009).

Este parasita encontra-se muitas vezes nos animais recém-nascidos, durante poucos meses depois de nascerem. Os parasitas adultos são grandes, brancos e têm de comprimento 10 a 15 cm.

#### a) Ciclo biológico

O ciclo evolutivo é muito complexo na superfamília, com quatro modos possíveis de infecção: directa ou oral, por ingestão de ovos embrionados; transplacentária ou pré-natal; galactogénea, pelo leite materno e através de hospedeiros paraténicos. Ainda inclui migrações traqueais e somáticas de larvas e pode ser encontrado em muitos tecidos do hospedeiro (Baños et al., 1999).

O ovo contém a L<sub>2</sub> e é infectante em temperaturas ideais, quatro semanas depois de ter sido eliminado. Após a ingestão e eclosão no intestino delgado, as L<sub>2</sub> seguem pela circulação sanguínea, via fígado para os pulmões, onde tem lugar a segunda muda, e as L<sub>2</sub> retornam via traqueia ao intestino, onde se dão as duas mudas finais. Esta forma de infecção ocorre regularmente apenas em cães de até três meses de idade. Quando tem mais de três meses de idade, a migração hepatotraqueal ocorre menos frequentemente e, aos seis meses, quase cessa. Em vez disso, as L<sub>2</sub> seguem para uma ampla variedade de tecidos, chegando ao fígado em 24-48 horas pela via portal. Algumas ainda continuam pelos pulmões, cérebro, coração, musculatura esquelética e paredes do tracto digestivo, provocando reacções inflamatórias por onde passam. Nas fêmeas prenhas, ocorre infecção pré-natal, as larvas mobilizam-se cerca de três semanas antes do parto e migram para os pulmões do feto, onde mudam para L<sub>3</sub> exactamente antes do parto. Nos recém-nascidos, o ciclo completa-se quando as larvas seguem para o intestino via traqueia, e ocorrem as mudas finais. As fêmeas, uma vez infectadas, normalmente abrigam larvas suficientes para infectar todas as ninhadas

subsequentes, mesmo que nunca mais entre em contacto com uma infecção. Algumas dessas larvas mobilizadas, em vez de ir para o útero, completam a migração normal na fêmea, e os parasitas adultos resultantes produzem aumento transitório, mas acentuado, na produção de ovos de *Toxocara* nas fezes nas semanas que se seguem ao parto (Urquhart et al., 1996; Baños et al., 1999; Bowman et al., 2009).

As crias lactantes também podem infectar-se por ingestão de L<sub>3</sub> no leite durante as três primeiras semanas de lactação. Não existe migração nas crias após a infecção por esta via.

Os hospedeiros paraténicos, como os roedores ou aves, podem ingerir os ovos infectantes, e as L<sub>2</sub> seguem para seus tecidos, onde permanecem até ser ingeridas por um canídeo, quando o desenvolvimento subsequente aparentemente se restringe ao tracto gastrointestinal.

Uma complicação final é a evidência recente de que as fêmeas podem reinfectar-se durante o final da gestação ou da lactação, resultando directamente em infecção transmamária dos recém-nascidos lactantes e, uma vez estabelecida a patência, em contaminação do ambiente com ovos (Urquhart et al., 1996; Bowman et al., 2009).

Existe um estudo que, pela primeira vez, referencia a presença deste parasita adulto no interior do pericárdio na região da junção do ventrículo e átrio direito, durante a necrópsia de uma raposa vermelha (*Vulpes vulpes*). No entanto, é raro para um ascarídeo adulto ser recuperado no exterior do intestino delgado (Gregory et al., 2002).

O período pré-patente deste parasita corresponde a 2 -3 semanas.

#### b) **Epidemiologia** (prevalências)

Este parasita ocorre em todo o mundo, onde existam carnívoros. Nos animais foram efectuados levantamentos de prevalência de *T.canis* em muitos países que demonstraram uma ampla variação de taxas de infecção, de 5% a mais de 80%. As prevalências mais altas foram registadas em cães com menos de 6 meses de idade, com as menores quantidades de parasitas nos animais adultos. Estas características devem-se a três factores: as fêmeas são extremamente fecundas podem produzir cerca de 700 ovos para cada grama de fezes por dia, os ovos são extremamente resistentes a extremos climáticos, sobrevivendo durante anos no solo e devido à ocorrência de um reservatório constante de infecção nos tecidos somáticos da cadela, sendo as larvas nestes locais insensíveis à maioria dos anti-helmínticos (Urquhart et al., 1996).

A infecção ocorre por ingestão de terra, alimentos ou água contaminados por ovos; estes saem para a terra nas fezes dos carnívoros. Alguns investigadores têm demonstrado a transmissão da larva de *T.canis* entre hospedeiros paraténicos (Baños et al., 1999; Bowman et al., 2009). Okoshi & Usui (1968) encontraram larvas deste parasita em ratinhos inoculados com larvas

provenientes de um rato ou de uma galinha. Pahari e Sasmal (1990) observaram uma elevada recuperação de larvas de *T. canis* em ratinhos inoculados com larvas provenientes de codornizes japonesas.

No que se refere aos Ascarídeos, em trabalhos realizados por Torres et al. (2000), sobre helmintofauna no lobo-ibérico, o *T. canis* foi o que apresentou maior taxa de prevalência. No entanto, este caso poucas vezes é registado, assim como podem comprovar outros estudos orientados na mesma ordem de trabalhos, como em Barbosa et al., (2005) que identificou maior prevalência para *T. leonina* em algumas províncias de Espanha.

### **c) Patogenia/Sintomas**

Os animais recém-nascidos que tenham uma infecção pré-natal muito severa têm um desconforto abdominal muito intenso, adoptando uma postura estranha com os membros posteriores quando se sentam e andam. Deste modo estes animais apresentam uma elevada excreção deste parasita, tanto formas imaturas como adultos, nas fezes e quando vomitam. Estes parasitas provocam grande desconforto e quando entram em grande agitação no interior do animal, formam-se um grande emaranhamento e nós de parasitas causando uma obstrução intestinal grave ou mesmo a ocorrência de uma rotura, levando à morte do animal. As obstruções dos ductos biliares e pancreáticos provocam excepcionais quadros patológicos (Bowman et al., 2009).

Após ingestão dos ovos, as larvas eclodem no intestino e penetram a mucosa intestinal, como já foi referido, e migram então pelo sangue para os vários órgãos (fígado, pulmões, cérebro, olhos ou músculos), provocando pelo caminho hemorragias e reacções imunitárias destrutivas. Nesta fase depois enquistam-se, permanecendo quiescentes (Baños et al., 1999).

As infecções são geralmente assintomáticas. Os sintomas dependem dos tecidos onde as larvas migram e se estabelecem. Pode manifestar-se a tosse, falta de ar, problemas neurológicos e de visão, que provavelmente devem-se à acção irritativa dos adultos no intestino ou às larvas erráticas no SNC. Paralelamente, são comuns as febres intermitentes, prurido com exantema cutâneo, perda de peso, diarreias, e possíveis hepatomegalias. O abdómen encontra-se muito dilatado, com reacção dolorosa à palpação, sendo frequente a eliminação de nemátodes com os vómitos ou de forma espontânea com as fezes (Baños et al., 1999).

Num estado crónico ocorre uma progressiva perda de peso com sinais de diarreia intermitente e, por vezes manifestações nervosas convulsivas periódicas (Baños et al., 1999).

As larvas vivem alguns anos, após o que degeneram e são absorvidas pelos tecidos.

#### **d) Diagnóstico**

É possível obter um diagnóstico presuntivo durante a fase pulmonar aquando de infecções maciças, em que as larvas migram, baseando-se no aparecimento simultâneo de sinais e sintomas de pneumonia numa ninhada, quase sempre dentro de duas semanas depois do nascimento (Urquhart et al., 1996).

Nos animais o diagnóstico definitivo é feito através de técnicas parasitológicas, observando-se a presença do parasita ou dos ovos nas fezes dos animais. A produção de ovos é tão elevada que não é necessário utilizar métodos de flutuação, sendo facilmente encontrados e observados em simples esfregaços de fezes aos quais se adiciona uma gota de água. Também pode efectuar-se um diagnóstico sorológico, pela detecção de anticorpos (Urquhart et al., 1996; Bowman et al., 2009).

O *T. canis* é um grande parasita branco que pode atingir os 10 cm. O ovo é castanho-escuro e subglobular, com uma casca espessa e com depressões (Urquhart et al., 1996). Apresenta ainda, um tamanho médio de 75  $\mu\text{m}$   $\times$  90  $\mu\text{m}$ , com forma esférica e/ou ovóide, o conteúdo é escuro (acastanhado), não segmentado e geralmente ocupa toda a cápsula.

#### **e) Aspectos Zoonóticos**

É o parasita mais comum dos carnívoros, também pode infectar o homem. As crianças são particularmente afectadas. Na Europa cerca de 5% dos adultos têm anticorpos contra ele, ou seja, já foram infectados. Nos países tropicais estes números são quase sempre mais de dois terços da população (Rochette, 2003).

Nos países desenvolvidos a sero-prevalência vai desde 7% até 30%, sendo considerado também o helminte com maior incidência de zoonose nos USA (Taira et al., 2004). No entanto a relação entre a seropositividade e a manifestação da doença está ainda por esclarecer.

Esta larva pode instalar-se no fígado, nos pulmões, nos músculos, nos olhos, coração e no cérebro. Em casos, muito pouco frequentes estas infecções podem levar à cegueira e provocar paralisia (Rochette, 2003).

A primeira descrição científica deste ascarídeo no homem teve lugar em 1782, por Wener. Fulleborn fez referência da possibilidade de uma infecção com larvas, em 1921. Quatro anos mais tarde, Chandler (India) defendeu a ideia de que o desenvolvimento das larvas também se processa no homem. Durante o período que posteriormente decorreu até ao ano 1950, foram publicados vários estudos de casos de eosinofilia, hepatomegália e infiltrações pulmonares devido às infecções por este nemátode (Rochette, 2003).

Em 1950, Mecer detectou a presença de uma larva de nemátode numa biópsia de fígado. Wilder encontrou que um dos olhos enucleados continha uma larva de nemátode, inicialmente identificada como uma larva de ancilostoma, pelo que mais tarde foi identificada correctamente por Nichols como *T.canis*. Em 1952, Beaver identificou uma larva numa autópsia de um fígado e introduziu a definição “larva *migrans visceralis*” (Rochette, 2003).

Um ano mais tarde, Beautyman encontrou uma larva no cérebro de uma criança que tinha morrido de paralisia. Também se estabeleceu a presença de larvas de *Toxocara* nos pulmões e no coração. Desde então, desenvolveram-se vários métodos de diagnóstico que puderam indicar a incidência de infecções larvares de *Toxocara* no homem (Rochette, 2003).

Hoje em dia, a toxocarose está bem documentada e constitui uma verdadeira preocupação para a Saúde Pública mundial (Despommier, 2003).

Pelo que se sabe até ao momento as pessoas infectam-se com ovos de ascarídeos infectantes. Estes ovos são pegajosos e podem estar presentes debaixo das unhas e aderem aos dedos com facilidade. Não se deve excluir a hipótese da infecção através de hospedeiros intermediários, porque estas podem sobreviver neste tipo de hospedeiros durante 9 anos.

A toxocarose em humanos, normalmente é causada pela ingestão de ovos a partir do solo contaminado em espaços públicos (praças, parque, praias, etc.). Contudo, algumas sociedades com determinados hábitos alimentares, nomeadamente a alimentação à base de tecidos animais crus ou mal cozinhados, também constituem um elevado risco de infecção, assim como a utilização de hospedeiros paraténicos em dietas animais.

A categorização das diferentes síndromes que afectam o ser humano, varia conforme o autor, embora o mais comum e frequentemente citado é: Larva Migrante Visceral (LMV) e as suas variantes Larva Migrante Ocular (LMO) e Larva Migrante Neurológica (LMN). Para além destas, ainda é referida uma forma encoberta da doença, por alguns autores (Nabais, 2008).

A forma conhecida como larva *migrans* visceral, caracteriza-se pela migração do estadio larval de *Toxocara canis* pelas vísceras humanas, causando processos patológicos hipereosinofílicos crónicos, que podem ser acompanhados por leucocitose e lesões granulomatosas (Guimarães et al., 2005). Acontece normalmente, quando a infecção ocorre com intensidade ou a pessoa esteve infectada com o parasita anteriormente. A larva *migrans* ocular é um termo usado quando os ovos ingeridos eclodem e as larvas migram para o olho, ao acontecer esta situação pode ocorrer a perda da visão.

Os sintomas podem incluir, ainda, tosse, pneumonia ou febre. É necessário um especial cuidado com as crianças.

### 3.1.1.1.2. *Toxascaris leonina*

O *Toxascaris leonina* é um parasita muito comum em canídeos, embora apresente uma menor frequência e importância do que o *Toxocara canis*, isto porque a sua fase parasitária é não-migratória e restringe-se apenas ao intestino delgado dos seus hospedeiros definitivos.

Este parasita pode ser confundido com o *Toxocara canis*, sendo a diferenciação possível através da sua observação à lupa. A diferenciação consta na presença de um pequeno processo digitiforme na cauda do *T.canis* macho (Urquhart et al., 1996), o qual está ausente no *T.leonina*. A fêmea adulta pode atingir 10 ou mais centímetros de comprimento.

#### a) **Ciclo biológico**

Os ovos desenvolvem-se rapidamente e normalmente atingem a fase infectiva numa semana, contrastando com as 4 semanas características do ciclo biológico das espécies de *Toxocara*, tornando maior a probabilidade de encontrar este parasita em animais mais velhos (Bowman et al., 2009).

Se os ovos são ingeridos por um roedor ou outro animal sem ser o hospedeiro definitivo, a larva pode eclodir do ovo e invadir as paredes do intestino, no qual pode residir durante uma semana antes de proceder a outros tecidos, onde enquista e permanece preso na fase infecciosa. Quando o hospedeiro definitivo (canídeos) ingere um ovo com a L<sub>2</sub> ou um roedor infectado, a larva invade a mucosa do intestino delgado, onde se desenvolve e muda para a fase madura, antes de retornar ao lúmen do intestino, não havendo fase migratória (Bowman, 2009). O período pré-patente é de cerca de 11 semanas.

#### b) **Epidemiologia** (prevalências)

O rápido desenvolvimento dos ovos pode explicar a persistência da infecção do *T.leonina* em colónias de canídeos, razoavelmente em boas condições e controlo sanitário (Bowman et al., 2009).

O ciclo biológico deste parasita também é caracterizado pelo rápido desenvolvimento da fase larvar infecciosa e pela fácil capacidade de parasitar os hospedeiros paraténicos, que consequentemente constituem um grande problema para o aumento da prevalência nos canídeos e contaminação do ambiente.

Nos trabalhos realizados por Eduardo Santos (2001) e Barbosa et al., (2005) este parasita apresentou sempre uma prevalência superior à de *T.canis*.

### c) Patogenia/Sintomas

Este parasita não apresenta qualquer expressão do ponto de vista zoonótico. Deste modo, as manifestações clínicas e patológicas nos animais são as que caracterizam os ascarídeos. Os parasitas adultos provocam o emagrecimento e a perda de forças em animais jovens e ocasionalmente, obstrução intestinal.

### d) Diagnóstico

O ovo de *T.leonina* não tem opérculos, é levemente ovóide, com cápsula espessa, lisa e decorada e conteúdo não segmentado, sendo característico nas fezes de carnívoros.

Os métodos de diagnósticos são semelhantes aos apresentados anteriormente no *T.canis*.

### 3.1.1.2. *Ancylostomatidae*

Os ancilostomídeos adultos são parasitas do intestino delgado. Os nemátodes da espécie *Ancylostoma caninum* causam a perda de grandes quantidades de sangue dos seus hospedeiros, enquanto outras, como *Uncinaria stenocephala* removem muito pouco. As glândulas do esófago de *A. caninum* produzem uma enzima proteolítica que impede a coagulação do sangue (Dunn & Greiner, 2005; Bowman et al., 2009).

São parasitas responsáveis pela elevada morbidade e mortalidade em animais, principalmente pela sua actividade hematófaga no intestino (Urquhart et al., 1996).

Os ancilostomídeos têm as extremidades anteriores com ganchos, muito características dos parasitas pertencentes à família *Ancylostomatidae*. Estes parasitas, possuem uma cápsula bucal bem desenvolvida, curvada dorsalmente e provida de estruturas dentiformes ou placas quitinosas cortantes, na sua margem ventral. Os machos, com bolsa copuladora bem desenvolvida, são encontrados frequentemente em cópula com a fêmea. A fêmea põe ovos do tipo estrangilídeo que quando são eliminados nas fezes encontram-se na fase de mórula (Baños et al., 1999; Bowman et al, 2009).

Na família *Ancylostomatidae* distinguem-se duas subfamílias: a subfamília *Ancylostomatinae* e a subfamília *Bunostomatinae*. Visto que os carnívoros domésticos apenas são parasitados naturalmente por membros da subfamília *Ancylostomatinae* (Bowman et al., 2009), assim como tal se sucede nos canídeos silvestres, com base nos estudo efectuados em muitos países da Europa, é só sobre essa que nos vamos debruçar.

Relativamente aos *Ancylostomatidae*, duas espécies apresentam maior relevância em canídeos, que são o *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1856) e o *Uncinaria stenocephala* (Railieta, 1884), por isso, seguidamente só eles serão referenciados.

### a) Ciclo Biológico

O ciclo evolutivo é directo, e se houver condições ideais os ovos amadurecem, as L<sub>1</sub> eclodem e desenvolvem-se até L<sub>3</sub>, em apenas cinco dias. As zonas sombreadas, solos mal drenados, calor e humidade são condições óptimas para o desenvolvimento e sobrevivência deste último estadio. A temperatura óptima para *A. caninum* é de 23-30 ° C e para a *U.stenocephala* é menor, cerca de 20 ° C (Dunn & Greiner, 2005; Bowman et al., 2009).

A infecção dá-se por penetração cutânea ou por ingestão, sendo ambos os métodos igualmente bem-sucedidos. Na infecção percutânea, as larvas migram via circulação sanguínea, passando então, através do coração aos pulmões. Eles furam para fora dos capilares pulmonares para os alvéolos, onde se transformam em L<sub>4</sub> nos brônquios e na traqueia, e em seguida são deglutidas e vão para o intestino delgado, onde ocorre a muda final. Esta migração para a traquéia tem aproximadamente 2 - 7 dias (Dunn & Greiner, 2005; Urquhart et al., 1996).

Se a infecção for por ingestão as larvas podem ou penetrar na mucosa bucal e sofrer migração pulmonar, já referida se for caso de *A.caninum*, ou ir directamente para o intestino e tornarem-se patententes. Quando as L<sub>3</sub> são engolidas e passam directamente para o intestino delgado, passam a L<sub>4</sub> logo 3 dias após a infecção, e depois para a fase adulta (Urquhart et al., 1996; Dunn & Greiner, 2005).

Qualquer que seja a via adoptada, o período pré-patente é de 14 a 21 dias. Estes parasitas fazem ovopostura prolifera, e um animal afectado pode eliminar milhões de ovos ao dia durante várias semanas (Urquhart et al., 1996; Bowman et al., 2009).

Depois da cópula no intestino, começa a eliminação dos ovos nas fezes, que pode ocorrer cerca de 2 semanas após a ingestão de larvas e cerca de um mês após a penetração da pele por larvas (Bowman et al., 2009), às vezes um pouco mais lento em cães idosos em que os parasitas encontram-se menos maduros (Dunn & Greiner, 2005).

A vida média dos adultos anda, normalmente, à volta dos 6 meses (Baños et al., 1999), mas podem viver até 2 anos (Dunn & Greiner, 2005).

Um aspecto importante da infecção por *Ancylostoma caninum* é no caso de fêmeas susceptíveis, uma proporção das L<sub>2</sub> que atingem os pulmões, migram para os músculos esqueléticos, onde permanecem latentes até à fêmea ficar gestante. São então, reactivadas, normalmente durante as 2 últimas semanas de gravidez, e, ainda como L<sub>3</sub>, são eliminadas no leite da fêmea durante um período de aproximadamente três semanas após o parto – infecção transmamária frequentemente é responsável pela anemia grave em ninhadas de crias na segunda ou terceira semana de vida. Contudo, não há certezas relativamente à transmissão pré-natal (Bowman et al., 2009).

Uma fêmea apenas exposta a uma infecção substancial por via oral ou percutânea ocorrerá a migração de larvas de *A. caninum* no seu leite nas próximas 3 lactações, embora a descarga de larva diminua com a ocorrência de cada lactação (Bowman et al., 2009).

Parece também que as L<sub>3</sub> latentes nos músculos podem recomeçar a migração meses ou anos mais tarde, amadurecendo no intestino do hospedeiro. Alguns factores, como stress, doença grave ou grandes doses de corticosteróides, podem todos precipitar essas infecções aparentemente novas em canídeos, que talvez possam residir num ambiente livre de ancilostomas.

No caso da *Uncinaria stenocephala*, a infecção oral é mais frequente, em detrimento da percutânea, que quando acontece não é seguida de migração traqueal, não concluindo, normalmente, o seu desenvolvimento. Ao mesmo tempo, não existem evidências que ocorra infecção placentária ou galactogénica (Baños et al., 1999; Dunn & Greiner, 2005).

Os hospedeiros paraténicos (p.e. ratos) podem ser infectados por via oral ou através da pele. As larvas não se desenvolvem muito nestes animais, mas tornam-se latentes em vários tecidos. *A. caninum* e *U. stenocephala* são encontrados principalmente nos músculos. Se um hospedeiro definitivo ingere essas larvas, estas libertam-se e completam o seu desenvolvimento para os adultos. Os gatos também podem ser infectados pela ingestão de baratas infectadas (OIE, 2005).

#### **b) Epidemiologia (prevalências)**

O *A. caninum* adulto pode colocar 7.000 - 28.000 ovos por dia. Os ovos desenvolvem-se na presença de oxigénio quando a humidade e temperatura também são favoráveis, uma vez que eles não se desenvolvem no centro de fezes contaminadas, mas podem fazê-lo quando as fezes são quebradas por artrópodes, minhocas, chuva ou outros meios mecânicos. Os ovos e larvas de vida livre de *A. caninum* são relativamente sensíveis ao congelamento; os da *U. stenocephala* são muito mais tolerantes a temperaturas baixas, possuindo também uma menor temperatura óptima de desenvolvimento de todos os estádios de vida livre (Dunn & Greiner, 2005).

Quanto maior a dose de larvas infectantes, menor é a percentagem de parasitas adultos que se desenvolve. Se a L<sub>3</sub> infectar um hospedeiro aberrante ou um hospedeiro normal resistente, elas podem migrar no corpo, sem nunca entrar no tracto intestinal e sem sofrer amadurecimento (Dunn & Greiner, 2005).

Os ancilostomídeos apresentam uma distribuição ampla entre os canídeos, sendo encontrados comumente no intestino delgado dos hospedeiros onde completam o seu ciclo de vida.

Algumas espécies alimentam-se, fixando-se a pedaços da mucosa do intestino delgado e em seguida, mudam de posição. As feridas podem continuar a sangrar depois do parasita sair, pelo menos por um curto período de tempo. Alguns parasitologistas consideram que eles talvez sejam os parasitas mais patogénicos dos carnívoros jovens (Dunn & Greiner, 2005).

Nas áreas endémicas, a doença é mais comum nos cães com menos de um ano de idade. Nos animais mais velhos, o desenvolvimento gradual de resistência etária torna menos provável a doença clínica, particularmente em cães criados em áreas endémicas cuja resistência etária é reforçada pela imunidade adquirida.

A epidemiologia está sobretudo associada com as duas principais fontes de infecção, a transmamária nas crias lactentes e a percutânea ou oral a partir do ambiente.

Um importante aspecto da infecção transmamária é que a doença pode ocorrer em crias lactentes criadas num ambiente limpo e amamentadas pela progenitora recentemente tratada com um anti-helmítico e com contagem negativa de ovos nas fezes.

Nos trabalhos realizados por Eduardo Santos (2001), Torres et al. (2000) e Torres et al. (2001), os *Ancylostomatidae* foram claramente os helmintes com maior prevalência na Península Ibérica.

Ainda na península Ibérica Balmori et al. (2000) registou uma prevalência deste nemátode em amostras de fezes de Lobo de três zonas do Norte de Espanha: 42,9% na Cordilheira Cantábrica, 20% nas província de León, Palencia e Burgos e ainda de 100% na Serra e Vales no Norte de Zamora, região esta que apresenta grande proximidade com Portugal. Ainda, Torres et al. (2001) registaram a prevalência de 29,7% num total de 64 amostras fecais de lobo e raposa nas localidades de Andorra, Galicia, Asturias, Castilha, León e Serra da Malcata.

Em Portugal, Torres et al. (2000) num estudo de 26 amostras fecais de lobo do Parque Natural do Alvão concluíram 57,7% de prevalência de ancilostomatídeos e Eira et al. (2006) num estudo mais recente de raposas na Dura de Mira, foi possível chegar á espécie, encontrando uma prevalência de 77,4% de *U. Stenocephala*.

### **c) Patogenia/Sintomas**

No período de invasão cutânea, de acordo com o número de larvas e a hipersensibilidade do hospedeiro, assim ocorrem dermatites urticariformes e infecções secundárias. No período migratório das larvas, geralmente silenciosa, mas pode haver sintomas de tosse, estertores e eosinofilia. No período de parasitismo intestinal as lesões da mucosa intestinal caracterizam-se por dilaceração da mucosa e hemorragia intestinal; espoliação sanguínea (perda de sangue: ingestão pelos parasitas e enterohemorragias) (Dunn & Greiner, 2005).

Deste modo, os sinais da infecção aguda incluem anemia, emagrecimento, edema, e pêlos arrepiados e outros efeitos da perda de sangue. Ocasionalmente pode ocorrer dificuldade respiratória, que pode ser oriunda da lesão larvar nos pulmões ou dos efeitos anóxicos da anemia. As crias intensivamente infectadas, geralmente apresentam diarreia, com fezes pretas que contém sangue concentrado e muco. A morte pode ocorrer, especialmente em cachorros e gatinhos (Dunn & Greiner, 2005).

Nas infecções crônicas, o animal, normalmente, perde peso, a pelagem é escassa, tem falta de apetite, fraqueza e apatia. Podem manifestar-se sinais de dificuldade respiratória, lesões cutâneas e claudicação (Urquhart et al., 1996).

#### **d) Diagnóstico**

Depende da sintomatologia clínica e da história, complementadas por exames hematológicos e de fezes. As altas contagens de ovos de parasitas nas fezes constituem uma valiosa confirmação de diagnóstico, mas deve-se observar que as crias lactentes podem demonstrar sintomatologia clínica grave antes da detecção de ovos nas fezes. Além disso, alguns ovos de ancilostomídeos nas fezes, embora confirmando a evidência de infecção, não indicam necessariamente que um canídeo adoentado seja portador deste parasita (Urquhart et al., 1996).

No caso do homem o diagnóstico da larva *migrans* cutânea é geralmente, baseado nos sinais clínicos. Ele pode ser confirmado por uma biópsia da pele afectada, mas as larvas raramente são encontrados e este teste não é geralmente o de diagnóstico (OIE, 2005).

Ulcerações no íleo e cólon, e ocasionalmente a presença do próprio parasita, podem ser vistos usando a colonoscopia. A serologia inclui testes de ELISA e immunoblotting (Western blot) e que se aplicam apenas em pesquisas (OIE, 2005).

Nos animais as infecções por parasitas são diagnosticados por flutuação fecal e detecção dos ovos. Os ovos de *Ancilostoma* típicos têm 55-76 µm de comprimento e cerca de 34-50 µm de largura, e tem uma parede lisa e fina. Eles não são embrionados aquando da sua primeira postura e abordagem, apresentando uma mórula com células, as quais se dividem e dão origem a uma mórula mais desenvolvida, algumas horas após a sua emissão. No caso do *Uncinaria* os ovos são muito semelhantes, mas ligeiramente maiores (70-90 µm x 40-50 µm); eles não podem ser facilmente distinguidos dos de *Ancylostoma* excepto em infecções mistas. No primeiro estadio larval de ancilostomídeos pode aparecer em fezes antigas, especialmente em lugares quentes e húmidos. Os ovos não são eliminados constantemente e poderão ser precisas repetições de amostragem para detectar infecções (OIE, 2005).

As larvas podem ser identificadas por cultura de fezes, se a identificação for ao nível de espécie. Os parasitas adultos podem ser diferenciados pela sua morfologia, através de chaves de identificação (OIE, 2005).

#### **e) Aspectos Zoonóticos**

O *A. caninum* é o mais difundido de todos os ancilostomídeos e pode ser encontrado em muitas partes do mundo. O *U. stenocephala* ocorre em climas mais frios, incluindo Canadá, os E.U. e Europa. Nos E.U., a larva *migrans cutânea* é principalmente encontrada nos estados do sul (OIE, 2005).

Nos seres humanos, as larvas de ancilostomídeo mais zoonóticas não conseguem sequer penetrar na derme. Elas continuam confinadas à epiderme, onde migram por um período de tempo, mas acabam por morrer. O *A. caninum* é ocasionalmente encontrado nos intestinos. A via de infecção deste parasita ainda é desconhecida, ou é percutânea ou transmissão oral; não se torna patente, mas foi apenas o único a ser encontrado na forma adulta em humanos (OIE, 2005).

O período de incubação da larva *migrans cutânea* é de curto prazo, mas vagamente estabelecido, de acordo com algumas estimativas, é de aproximadamente 1 a 2 semanas. O período de incubação para ancilostomose clássica varia com o número de parasitas e pode ser de algumas semanas a muitos meses (OIE, 2005).

A “larva *migrans cutânea*” (LMC) é uma dermatite provocada pela migração de larvas de nematódes, no extracto epitelial da pele humana, sendo que no Brasil, *Ancylostoma braziliense* e *A. caninum*, constituem os principais nematódes envolvidos (Guimarães et al., 2005). A maioria das lesões localizam-se nas pernas, nádegas e nas mãos, mas podem ser encontradas em qualquer parte do corpo que foi exposta ao solo contaminado com as larvas infectantes L<sub>3</sub>. Inicialmente, pode haver um formigueiro ou sensação de formigueiro onde as larvas penetraram na pele, seguido de uma pápula no mesmo local. A migração das larvas de forma lenta resulta numa reacção alérgica na pele por onde eles passam. As lesões podem incluir pápulas, bem como dermatites não específicas, vesículas, eritemas e são intensamente pruriginosas, especialmente à noite. A dor está relacionada, ocasionalmente, em associação com a existência de vesículas. As infecções bacterianas secundárias podem ocorrer em algumas situações. Na maioria, os casos resolvem-se espontaneamente em dois dias a várias semanas, mas tem havido casos em que as lesões duraram mais de um ano (OIE, 2005).

Outras lesões podem ocorrer, quando as larvas penetram para além da epiderme. As larvas de *A. caninum* ocasionalmente migram para os músculos, resultando em miosites com inchaço

persistente. Essas larvas podem também causar sinais sistêmicos e foliculite. Também já foi documentada a existência de larvas de *Ancylostoma* no olho (OIE, 2005).

A enterite eosinofílica é causada por ancilostomídeo zoonótico, *A. caninum*. Caracteriza-se pela ocorrência graves episódios de dor abdominal associada a eosinofilia periférica, mas sem perda de sangue. Casos graves podem simular apendicite ou perfuração intestinal. Algumas infecções podem, mesmo ser assintomáticas (OIE, 2005).

### **3.1.1.3) *Strongyloides***

Os helmintes do género *Strongyloides* são nemátodes rhabditiformes que parasitam os canídeos, pertencendo à ordem Rhabditoidea, família Rhabditidae, cujas fêmeas apresentam pequenas dimensões, de 2.5-4 mm × 30-50 µm de diâmetro. O esófago pode ocupar até um terço do comprimento do corpo, o útero apresenta-se entrelaçado com o intestino e a cauda tem ponta obtusa. Só as fêmeas podem ser parasitas, pois os machos vivem sempre livres no solo, alimentando-se de detritos orgânicos por toda a vida (Urquhart et al., 1996; Baños et al., 1999).

Os parasitas deste género são comuns no intestino delgado de animais muito jovens e apesar de ter pouco significado ao nível da patogenia, em determinadas circunstâncias podem dar origem a uma enterite grave (Baños et al, 1999).

Neste trabalho, entre as espécies existentes, faz mais sentido destacar a *Strongyloides stercoralis* (Babay, 1876) uma vez que é a responsável por infectar os canídeos e o homem.

#### **a) Ciclo Biológico**

Este parasita tem uma importância veterinária notável, uma vez que apresenta um ciclo reprodutivo tanto parasitário como de vida livre. Na fase parasitária as fêmeas reproduzem-se assexuadamente por partenogénese (põem ovos-clones, todos do sexo feminino, sem fecundação por espermatozóide) no intestino delgado; enquanto as formas livres são de reprodução sexuada.

O ciclo biológico deste nemátode é directo, de modo que os seus ovos depositados pelas fêmeas já estão embrionados com larvas do primeiro estadio (L<sub>1</sub>) e eclodem rapidamente; fora do hospedeiro as larvas mudam até atingirem o estadio infectante (L<sub>3</sub>) em 24-48 horas. Por sua vez, estas larvas encontram-se na água e no solo húmido nos locais de repouso onde contactam com os hospedeiros e os infectam através da pele, isto porque a via digestiva é menos frequente de acontecer. No mecanismo de penetração cutânea intervem activamente a

acção enzimática das larvas. Estas mesmas acabam por migrar para a circulação sanguínea, passando pelos pulmões e chegando por último aos intestinos em 3-4 dias.

As fêmeas de vida livre podem acasalar com machos (que são sempre de vida livre), produzindo sexualmente ovos que se desenvolvem em larvas (geneticamente diversas e não-clones), isto é, larvas rhabidiformes heterogónicas que, com raras excepções, desenvolvem-se somente em larvas infecciosas. Logo, as larvas descendentes machos continuam a viver livremente na terra, mas as larvas femininas apesar de também serem capazes de sobreviver na terra, se tiverem oportunidade infectam um hospedeiro (Bowman et al., 2009).

O principal modo de transmissão das espécies de *Strongyloides* parece ser a transmamária. Isto ocorre em canídeos, equinos, suínos e ruminantes. Quando ocorre uma infecção inicial, algumas larvas tendem a migrar para tecidos mais profundos do corpo, do qual são depois transmitidas aos descendentes no colostro e leite (Bowman et al., 2009).

Depois do período pré-patente de 1-2 semanas, os adultos localizam-se no intestino delgado, preferencialmente no duodeno e jejuno (Urquart et al., 1996; Baños et al., 1999).

## **b) Epidemiologia**

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) haverá 100 milhões de pessoas infectadas. Existe em todo o mundo, mas é mais predominante nas regiões tropicais. Afecta o homem assim como outros primatas e ainda raramente cães. A infecção dá-se pela penetração das larvas na pele nua, logo é frequente em agricultores de campos irrigados e em pessoas que trabalham em canis.

O *S. stercoralis* tem uma prevalência muito baixa em sociedades onde a contaminação fecal do solo ou a água é rara. Por isso, é uma infecção menos frequente em áreas urbanas e em países em desenvolvimento do que nas áreas rurais, onde os padrões de saneamento são precários. O *S. stercoralis* pode ser encontrado em regiões com climas tropicais e subtropicais.

A estrogiloidose parece ter uma prevalência elevada em algumas regiões do Brasil e da América Central. A estrogiloidose é endémica em África, mas a prevalência é normalmente baixa (1% ou menos). Nas ilhas do Pacífico a estrogiloidose é rara, embora tenha havido casos em Fiji. Na Austrália tropical, algumas comunidades aborígenas rurais e remotas têm uma prevalência muito elevada deste parasita.

Num estudo de Barbosa et al. (2005) foram analisadas 321 amostras de vísceras de raposas colhidas ao longo dos últimos quase 30 anos, e num total de 47 províncias de Espanha, 34 apresentaram resultados positivos, nomeadamente a presença de 34 espécies de helmintes e o

*Strongyloides* foram encontrados somente numa província. Perante isto, conclui-se que poucos são os registos acerca deste parasita na Península Ibérica.

### **c) Patogenia/sintomas**

A importância da infecção por *Strongyloides sp* reside no aparecimento de diarreia, pneumonia e dermatites. Efectivamente, pode constituir um grave problema se se encontrar em locais de criação com más condições de higiene, pela reinfeção a que os animais estão dispostos, principalmente os animais mais jovens. A infecção causa alterações cutâneas (dermatites) com prurido e alopecia. Os sintomas pulmonares têm tendência a complicar com associação de pneumonias infecciosas, pelo que normalmente os animais manifestam tosses, hemoptise e broncopneumonia ligeira. O período de incubação é de 2 ou 3 semanas.

Na fase intestinal muitos são assintomáticos, no entanto em alguns casos, segundo a intensidade da infecção, pode haver dor, diarreias moderadas, por vezes, sanguinolentas ou esteatorreia e ainda flatulência. Quando a enterite não é hemorrágica, as manifestações evoluem rapidamente e, como consequência, a gravidade fica associada à inflamação, acompanhada de úlceras, necrose e edema da mucosa duodenal com má absorção dos nutrientes. Em animais subnutridos pode levar à perda de peso e síndromes por défice de vitaminas lipofílicas (Baños et al, 1999).

A eosinofilia não ultrapassa, normalmente os 15%. Além destes sintomas, também pode ocorrer inapetência, vômitos, dor abdominal, perda de peso e em casos graves, pode levar à desidratação, apatia e em certas situações pode mesmo ser fatal em 2 semanas. A idade do hospedeiro é relevante, uma vez que este parasita manifesta-se clinicamente nos animais mais jovens (Baños et al, 1999).

### **d) Diagnóstico**

O diagnóstico realiza-se por métodos coprológicos de flutuação, a partir de amostras de fezes recentes ou pela pesquisa de larvas L<sub>1</sub> através do método de Baermann, devido à eliminação intermitente de larvas (Baños et al., 1999).

Outras técnicas utilizadas incluem esfregaços directos de fezes, cultura de amostras de fezes em placas de agár, raspagens de pele aquando da ocorrência de dermatites, através de diagnóstico sorológico de ELISA e fumigação duodenal. Ainda assim, o diagnóstico pode ser difícil por causa da variação de carga diária dos parasitas juvenis.

Os ovos dos *Strongyloides* não têm opérculo polar, são ovóides, com paredes delgadas, apresentando uma larva L<sub>1</sub> bem notável e característica no seu interior (Urquhart et al., 1996).

Pode realizar-se também a pesquisa de larvas L<sub>1</sub> nas secreções e coprocultura, além dos métodos imunológicos como Imunofluorescência Indireta (IFI) e Radioimunoabsorção.

#### **e) Aspectos zoonóticos**

A infecção das larvas fêmeas é por penetração directa (rápida e indolor) da pele intacta (pés descalços na terra molhada). Após invasão de um ser humano, a larva passa para a corrente sanguínea, no lúmen das veias e passando pelo coração, vai estabelecer-se no pulmão.

A infecção no homem é única, no que diz respeito à sua cronicidade. Esta infecção pode persistir durante décadas ou para toda a vida, devido ao desenvolvimento da fase larvar filarióide infecciosa, dentro do aparelho digestivo do paciente. Estas larvas podem reinvasar o hospedeiro, penetrando na mucosa intestinal (autoinfecção interna) ou na pele perianal (autoinfecção externa). Isto acontece, porque ao contrário de quase todos os outros parasitas, que excretam ovos, nesta condição também são excretadas larvas pelas fezes (Bowman et al., 2009). É por isso considerado um parasita com carácter infeccioso.

Em indivíduos com sistema imunitário saudável, a autoinfecção é eficientemente combatida, mas em imunodeprimidos e outros, a autoinfecção pode causar problemas muito graves devido à multiplicação e constante invasão das larvas. Nestes casos há por essa razão disseminação das larvas, causando danos nos órgãos como no pulmão, fígado ou canais biliares (Bowman et al., 2009).

A infecção pode então, eternizar-se devido à autoinfecção, mesmo em indivíduos com sistema imunitário competente.

O *S. stercoralis* é, portanto, um parasita zoonótico e as infecções podem ser estabelecidas entre canídeos e o homem. O papel epidemiológico do cão na infecção por *S. stercoralis* em humanos foi realmente documentado por um único relatório que testemunha a transmissão natural entre estes hospedeiros (Georgi & Sprinkle, 1974). Pesquisas recentes evidenciam a infecção de cães em canis e a não infecção dos tratadores, embora algumas destes últimos estivessem serologicamente positivos para *S. stercoralis* no diagnóstico por ELISA (Bowman et al., 2009).

#### **3.1.1.4) *Trichuris***

O *Trichuris* é o género mais importante da família *Trichuridae* e subfamília *Trichurinae*. Também é conhecido por “parasita látigo” pela sua morfologia característica, com a parte anterior longa e delgada e a posterior muito mais grossa (Baños et al., 1999).

As formas adultas, em geral, são encontradas somente em mamíferos (Bowman et al., 2009) com localização no ceco, mas apenas, ocasionalmente em quantidades suficientes para ter importância clínica. Estes mesmos medem aproximadamente 4 a 8 centímetros de comprimento, sendo o extremo anterior delgado, que fica fixado na mucosa, e a parte posterior de 4 a 5 vezes mais grossa. Os machos têm uma cauda encaracolada com uma só espícula (9-11 mm), que se aloja numa bolsa grossa e espinhosa. As fêmeas têm uma vulva no princípio do extremo grosso, ligeiramente encurvada.

Os ovos em condições ótimas (28-32°C) são infectantes ao fim de 9 ou 10 dias. Se a temperatura for um pouco mais baixa podem durar dois meses a embrionar. Os ovos infectantes podem permanecer viáveis durante mais de 5 anos e tolerar o frio até aos -20°C (Rochette, 2003).

A espécie que se destaca deste género corresponde exactamente ao *Trichuris vulpis* (Froelich, 1789), tendo, então com principais hospedeiros os canídeos domésticos e selvagens.

#### **a) Ciclo Biológico**

Os ovos quando eliminados nas fezes contêm apenas uma única célula e não são infectantes (Bowman et al., 2009). O estágio infectante é a L<sub>1</sub> no ovo, que se desenvolve em um ou dois meses após a sua eliminação nas fezes, dependendo da temperatura. Em condições ideais, podem sobreviver, subsequentemente por vários anos.

Após a ingestão, os opérculos são digeridos e as L<sub>1</sub> depois de eclodirem, penetram então, na parte superior do intestino delgado, onde permanecem 2-10 dias antes de migrarem para as glândulas da mucosa cecal onde executam 4 mudas, antes de se converterem em adultos (Rochette, 2003). Os adultos emergem e ficam à superfície da mucosa com a extremidade anterior encravada nesta mesma, não havendo migração extraintestinal (Urquhart et al., 1996; Bowman et al., 2009).

Os pequenos hospedeiros de transporte, como os alguns roedores, desempenham um papel muito importante na disseminação dos ovos (Rochette, 2003).

A primeira parte do ciclo biológico, que compreende a fase histotrófica, todavia não está bem clara. Às vezes, o desenvolvimento das larvas na mucosa intestinal demora 3 meses. O período pré-patente vai de 9 a 12 semanas, dependendo da espécie. O parasita vive aproximadamente 16 meses (Rochette, 2003).

#### **b) Epidemiologia (prevalências)**

Os aspectos mais importantes deste parasita, reside na longevidade dos ovos, que depois de três ou quatro anos ainda podem sobreviver como reservatórios de infecção em pocilgas, em

estábulo ou canis. Na pastagem, este facto é menos provável, pois os ovos tendem a ser lavados no solo, como consequência de factores ambientais. Contudo, o ovo é muito resistente à degradação ambiental. A contaminação ambiental pode levar a uma futura infecção e à reinfecção.

Os ovos de *T. vulpis* são prevalentes em áreas de solo húmido, obscuras, que foram contaminadas por fezes caninas.

O *T. vulpis* infecta canídeos no mundo inteiro. Os canídeos domésticos da Europa ocidental, apresentam uma baixa prevalência deste parasita (1-5 %), ao contrário dos Estados Unidos, Itália, Roménia e Suíça (Rochette, 2003).

Nos Estados Unidos, foi registado que 14,3% dos cães de canis estão infectados com este parasita. Embora, existam alguns casos de infecção humana.

A presença destes parasitas no lobo, tem sido citada em Espanha por Balmorí et al. (2000) com uma média de 26,5% de prevalência e Segovia et al. (2001) que encontrou com uma frequência de 10,6%. Shimalov (2000) considerando-o raro, apenas 3,9% dos lobos na Bielorrússia, enquanto Papadopoulos et al. (1997) menciona-o em raposas na Grécia (Rochette, 2003). Em Portugal, Torres et al. (2000) apresenta uma prevalência de 11,5% para tricurídeos, incluindo *T. vulpis* e *E. aerophilus*.

A prevalência na raposa está descrita num trabalho levado a cabo nas Dúrcias de Mira em Portugal por Eira et al. (2006) e Barbosa et al. (2005) em Espanha, mas ambas com baixos valores.

### **c) Patogenia/sintomas**

Uma vez ingerido pelo hospedeiro definitivo, os ovos eclodem e as larvas resultantes vivem no intestino delgado. Neste ponto, apesar de infectado, o canídeo ainda é assintomático. As infecções provocadas por este parasita são leves na sua grande maioria e assintomáticas. Quando às formas adultas de *T. vulpis*, estas vivem principalmente no ceco com a sua extremidade anterior anexada à mucosa superficial e sua extremidade posterior alargado para o lúmen do ceco, onde suga o sangue do hospedeiro e, ocasionalmente em grande número, provocam anemia, perda de peso e uma inflamação diftérica da mucosa cecal, com diarreia sanguinolenta e em casos extremos, a morte. Isto resulta da localização subepitelial e do movimento contínuo da extremidade anterior do parasita em busca de sangue e líquido. Está descrito um caso num cão que apresentava 2,612 adultos de *Trichuris* (Urquhart et al., 1996; Rochette, 2003).

No entanto há infecções por *Trichuris* que provocam anemia e diarreia crónica, o que poderá levar a uma desidratação fatal, com défice de sódio, excesso de potássio e acidose (Rochette, 2003).

A doença esporádica causada por infecções maciças é mais comum em suínos e cães, estando associada a diarreia aquosa habitualmente, contendo sangue (Urquhart et al., 1996).

Em qualquer caso, os efeitos patogénicos, sobre os hospedeiros, são agravados com a infecção concomitante de nemátodes de outras espécies de parasitas (Balmori et al., 2000) ou infecções secundárias por bactérias (Vasconcellos et al., 2006).

#### **d) Diagnóstico**

Os sinais clínicos não são patognomónicos, o diagnóstico pode depender do achado da quantidade de ovos de *Trichuris* nas fezes. Entretanto, como pode ocorrer sintomatologia durante o período pré-patente, o diagnóstico pode depender da necrópsia em animais de produção ou da resposta favorável aos tratamentos com anti-helmínticos, como no caso dos cães (Urquhart et al., 1996).

Os canídeos infectados podem ter períodos de fezes diarreicas com sangue e muco. A infecção causada por *Trichuris* exige métodos laboratoriais específicos para o diagnóstico correcto. Deste modo, identificar este parasita é um desafio por várias razões: O período pré-patente é um pouco menos de 3 meses, os primeiros ovos podem ser recuperados a partir das fezes, e os sinais clínicos podem ser observados antes de começar a produção de ovos; as fêmeas não produzem ovos todos os dias. Comparado com muitos outros parasitas intestinais, a produção de ovos é bastante pequena. Por causa da eliminação de ovos de forma intermitente, recomenda-se que as amostras fecais devem ser recolhidas durante um período de 2 dias antes de descartar tricurirose; como os ovos são tão densos (Gravidade específica de 1,15), uma solução para a flutuação deve ter um peso específico de pelo menos 1,20. Um estudo que compara o número de ovos recuperados a partir de 2 diferentes volumes de fezes retiradas para 5, 10 ou 20 minutos, sugere que se faça um maior volume de fezes e um aumento de tempo de espera para a observação, deste modo, é maior a probabilidade de encontrar os ovos de *T. vulpis*. A centrifugação com solução de açúcar (Gravidade específica de 1,27) ou solução de sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ; Sp. Gr 1,20) é o recomendado na técnica para análise de fezes, porque aumenta a hipótese de encontrar os ovos.

Os ovos característicos têm o formato de limão, com dois opérculos polares salientes, com cápsula lisa; nas fezes apresentam uma coloração amarela ou castanha. Como estes parasitas efectuam a ovopostura de forma irregular, é possível que não se encontrem ovos em forma de

limão, como é habitual. Os dados da necrópsia indicam que a taxa de infecção é muito mais alta do que o que aparece nas análises coprológicas (Rochette, 2003).

#### **e) Aspectos Zoonóticos**

Os cães desempenham um importante papel como fonte de contaminação ambiental de parasitas com potencial zoonótico, necessitando maior atenção da população em relação à saúde destes animais, visando a diminuição do risco de infecção para o homem e aos próprios animais.

É, portanto, uma doença tropical, que afecta principalmente as crianças. Os sintomas caracterizam-se por dor abdominal, diarreia profusa com muco e sangue, perda de peso, anemia e prolapso rectal.

Têm-se observado casos isolados de infecção humana com *Trichuris vulpis* como por exemplo, um caso nos Estados Unidos numa intervenção cirúrgica ao apêndice. No entanto, a espécie que apresenta maior importância médica é o *T.trichiura*.

O diagnóstico consta na observação microscópica de ovos de *T. vulpis* nas fezes. Apesar de estes serem bastante parecidos com os de *T. trichiuria*, no entanto estes podem ser distinguidos dos primeiros, uma vez que apresentam quase metade do seu tamanho (50-56 µm de comprimento e 21-26 µm de largura), sendo por isso necessário proceder-se à sua medição microscópica.

Apesar de o *T.vulpis* ser pouco reportado em humanos é considerado uma zoonose, porque nestes casos referidos, tem-se constatado a associação da infecção por contacto com animais contaminados. O homem infecta-se por falta de cuidado ao manipular os meios de transmissão, nomeadamente alimentos mal lavados e nas crianças quando brincam com a terra em actividades ao ar livre ou com animais.

Apesar de haver ainda alguma relutância em considerar este parasita zoonótico, a verdade, é que há casos em que o *T.vulpis* é responsável por tricurirose em seres humanos e também identificado como tendo um papel importante na etiologia da síndrome da larva *migrans* (Cerbo et al., 2008).

### **3.1.2. Céstodes**

Os Céstodes são parasitas que apresentam o corpo achatado sem canal digestivo, segmentado em que cada segmento contém um e, às vezes, dois conjuntos de órgãos reprodutores masculinos e femininos. Quase todos os cestóides de importância veterinária estão na ordem *Cyclophyllidea*, restando as duas excepções que estão na ordem *Pseudophyllidea* (Urquhart et

al., 1996). Neste trabalho só será apresentada a primeira ordem referida de acordo com as espécies que existem nos canídeos estudados neste trabalho.

Na ordem *Cyclophyllidea* o cestode adulto é constituído de cabeça ou escólex com órgãos de fixação, pescoço curto não-segmentado e uma cadeia de segmentos. A cadeia é conhecida como estróbilo e cada segmento como proglote (Urquhart et al., 1996).

Os órgãos de fixação são as quatro ventosas nos lados do escólex e podem conter ganchos. O escólex em geral, apresenta anteriormente um cone projectável móvel ou rostelo em algumas espécies, que pode também ser guarnecido por uma ou mais fileiras concêntricas de ganchos que ajudam na fixação (Urquhart et al., 1996).

Os proglotes desenvolvem-se continuamente da região do colo e tornam-se sexualmente maduros na porção final do estróbilo. Cada proglote é hermafrodita, com um ou dois conjuntos de órgãos reprodutores, os poros genitais abrem-se, usualmente no bordo ou nos bordos laterais do segmento; como isto pode ocorrer tanto autofertilização como a fertilização cruzada entre proglotes (Urquhart et al., 1996).

A estrutura do sistema genital, geralmente é semelhante à dos Tremátodes. À medida que o segmento amadurece, a sua estrutura interna desaparece amplamente e o proglote totalmente maduro ou grávido finalmente contém apenas vestígios do útero ramificado cheio de ovos. Os segmentos grávidos em geral saem intactos dos estróbilos e são eliminados com as fezes. No exterior do hospedeiro, os ovos são libetados por desintegração do segmento ou saem através do poro genital (Urquhart et al., 1996).

De entre as espécies de céstodes que parasitam naturalmente estes canídeos, no nosso país, as que possuem historicamente maior importância são, sem dúvida, as pertencentes à Ordem *Cyclophyllidea*. Deste modo, as espécies com maior preponderância, e que têm os canídeos como principais hospedeiros definitivos, são as seguintes:

- Família *Taeniidae*:

- *Taenia hydatigena* (Pallas, 1766);
- *Taenia ovis* (Cobbold, 1869);
- *Taenia multiceps* (Leske, 1780);
- *Taenia serialis* (Gervais, 1847);
- *Taenia pisiformis* (Bloch, 1780);
- *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786).
- *Echinococcus multilocularis*

- Família *Dipylidiidae*:

- *Dipylidium caninum* (Linnaeus, 1758).

### a) Ciclo Biológico

No caso da família *Taeniidae* os hospedeiros definitivos são geralmente os canídeos silvestres ou domésticos, menos comumente os felídeos e o Homem; e os metacéstodes desenvolvem-se nos órgãos internos, principalmente no fígado e / ou pulmões dos hospedeiros intermediários, geralmente herbívoros ou mamíferos omnívoros (Jenkins, 2005).

O ciclo biológico típico destes céstodes é indirecto com um hospedeiro intermediário. O céstode adulto localiza-se no intestino delgado do hospedeiro definitivo, salvo algumas excepções, os segmentos e os ovos atingem o exterior pelas fezes.

As oncosferas dos ciclofilídeos estão completamente desenvolvidas quando saem nas fezes do hospedeiro definitivo e são imediatamente infectantes para o hospedeiro intermediário (Bowman et al., 2009). Quando o ovo é ingerido pelo hospedeiro intermediário, as secreções gástricas e intestinais digerem o embrióforo e activam a oncosfera. Esta possui ganchos com os quais consegue lacerar a mucosa do intestino e atinge a circulação sanguínea ou linfática ou, no caso dos invertebrados, a cavidade celómica. Neste estadio a oncosfera perde os seus ganchos e desenvolve-se, dependendo da espécie, em um dos seguintes estadios larvares – Metacéstodes.

- Cisticerco: quisto cheio de líquido contendo um único escoléx invaginado fixo, denominado protoescólex.

- Cenuro: semelhante ao cisticerco, mas com numerosos protoescólices invaginados

- Estrobilocerco: o escólex é evaginado e liga-se ao quisto por uma cadeia de proglotes assexuados. Os últimos são digeridos após a ingestão pelo hospedeiro definitivo, deixando apenas o escólex.

- Hidátide: é um grande quisto cheio de líquido revestido por epitélio germinativo do qual são produzidos escólices invaginados que ficam livres ou em cachos, circundados por epitélio germinativo (vesículas filhas). Às vezes, também se formam endogenamente vesículas filhas completas com cutícula e camada germinativa ou, se a parede se romper, exogenamente.

Quando o metacéstode é ingerido pelo hospedeiro definitivo, o escólex fixa-se na mucosa, o restante da estrutura é digerido e começa a crescer uma cadeia de proglótes a partir da base do escólex.

Na ordem Cyclophyllidea existem sete famílias de interesse veterinário, que são: *Taeniidae*, *Anoplocephalidae*, *Dilepididae*, *Davaineidae*, *Hymenolepididae*, *Mesocestoididae* e *Thysanosomidae*.

## **b) Epidemiologia** (prevalências)

Um dos factores de maior interesse é o número de ovos eliminados e a sua distribuição pelo meio ambiente, o que varia em função da espécie do céstode e apresenta uma relação com o número de exemplares presentes no intestino e com o ritmo de eliminação dos proglotides. Logo, o potencial biótico é muito inferior nos *E. granulosus* do que nas grandes ténias (Sánchez-Acedo et al. 1999).

No entanto, e de forma geral, os céstodes apresentam uma distribuição cosmopolita. A prevalência é variável e está condicionada por diversos factores epidemiológicos, especialmente a forma de vida dos hospedeiros. A infecção pelo *Dipylidium caninum* é comum nos locais onde existem pulgas com abundância que intervêm como hospedeiros intermediários, nomeadamente nas zonas urbanas e rurais. Ao contrário dos outros géneros, como as *Taenia* ou o *Echinococcus* que estão mais ligados ao consumo de carne ou vísceras de animais herbívoros, pelo que estão mais associados ao contacto com gado ou hábitos de predação e, portanto, mais distribuídos, predominantemente nas zonas rurais (Sánchez-Acedo et al. 1999).

A percentagem de parasitismo é altamente variável em função da zona de estudo. Por exemplo, a prevalência do *Dipylidium caninum* em diversos países do mundo oscila entre 1 e 88,3% em cães e entre 2,8 e 81,6% em gatos. Na Grécia, Papadopoulos et al. (1997), reportam num estudo a prevalência de 50% nos lobos e apenas 3,1% nas raposas, caso estranho, considerando a frequência de ectoparasitas em ambas as espécies de animais.

As pulgas do género *Ctenocephalides*, *Pulex irritans* e o *Trichodectes canis* são os hospedeiros intermediários de *D. caninum*, existindo uma relação directa entre a sua prevalência e o nível de infestação por estes ectoparasitas, que é elevada entre os canídeos silvestres e rurais mais descuidados (Urquhart et al. 1987, Sánchez-Acedo et al. 1999).

A prevalência de *Echinococcus granulosus* em cães oscila entre os 18 - 60% no Sul da América, 2 - 63% em África e entre 2 - 70% na Europa, com uma média de 2,5% em Espanha, pelo que apresenta grandes variações consoante as regiões em causa (Sánchez-Acedo et al. 1999).

Em geral, os céstodes adultos são fracamente patogénicos para os carnívoros. Contudo, a infecção por metacéstodes (quistos hidáticos, cisticercos, cenuros) provoca importantes perdas económicas em diversas espécies de mamíferos domésticos, que participam como hospedeiros intermediários, uma vez que originam uma descida da produção animal e a rejeição das vísceras ou carcaças parasitadas. Deste modo, apresenta graves repercussões sanitárias sejam causa de zoonoses maiores (*Echinococcus*) ou menores (*Dipylidium*, *Taenia multiceps*).

Os *Echinococcus* são, então, céstodes de grande importância médica e veterinária, porque a infecção com metacéstodes pode causar doenças graves e a morte no hospedeiro intermediário. Pelo menos uma espécie deste género ocorre em todos os continentes habitados do mundo. Neste mesmo género existem, recentemente novas áreas endémicas. A infecção com a forma quística do estadio intermediário de todas as espécies de *Echinococcus* causa doença e incapacidade em animais e humanos, e nos casos mais graves, a morte do hospedeiro. A transmissão deste parasita para os novos continentes ocorreu durante a colonização europeia e dos animais selvagens que funcionam como reservatórios nestes novos ambientes, integrando este parasita num novo padrão de transmissão (Jenkins et al., 2005).

O *Echinococcus granulosus* e o *E. multilocularis* são os membros mais importantes do género em relação a sua importância para a saúde pública e sua distribuição geográfica.

A transmissão de *Echinococcus*, particularmente dentro do ciclo doméstico, é influenciada pelas actividades e comportamento do homem e da presença de animais silvestres que actuam como reservatórios (Jenkins et al., 2005).

O ciclo de transmissão típico na Europa envolve raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) como hospedeiros definitivos e roedores (especialmente *Microtus arvalis* e *Arvicola terrestris*) como hospedeiros intermediários. Para as áreas endémicas do oeste da Europa central, a maior parte da biomassa do parasita é estimada para estar presente no ciclo da vida silvestre. Os carnívoros domésticos também são infectados esporadicamente, o que parece ter uma importância secundária para o ciclo de vida deste parasita. No entanto, desempenham um papel fundamental na transmissão aos seres humanos devido ao maior contacto directo. Os cães apresentam maior período de patência do que as raposas, contudo as baixas taxas de infecção em cães na Europa justificam-se provavelmente, pela baixa exposição ao parasita. A adequação dos gatos como hospedeiros definitivos é menos clara. As infecções em javalis e suínos domésticos são auto-limitantes, sem desenvolvimento de protoescolices (Janovsky, et al., 2002; Jenkins et al., 2005).

Não há registos de *E. multilocularis* na Península Ibérica. No entanto, na Europa Central, há uma correlação entre o aumento da população de raposa (como o resultado do sucesso das raposas na imunização contra a raiva desde o início de 1990) e o aumento da prevalência da *E. multilocularis* em animais silvestres (Jenkins et al., 2005).

As taxas de infecção por *E. multilocularis* pode ser elevada e a proximidade entre as raposas e o homem representa um risco de infecção considerável. A transmissão ao homem não ocorre directamente entre as raposas infectadas, mas sim entre os cães e gatos que ficam infectados por captura de roedores nos parques e jardins da cidade e por contacto directo ou indirecto com as raposas nos meios rurais (Jenkins et al., 2005).

### c) Patogenia/Sintomas

Depende de factores como a espécie de cestode, intensidade da infecção, duração da mesma e estado de imunidade do hospedeiro. Em geral, os cestodes adultos são pouco patogénicos para os carnívoros, apesar de que a sua presença tem como consequência diversas acções patogénicas do tipo traumático ou espoliativo (Sánchez-Acedo et al. 1999; Bowman et al. 2009).

Os efeitos traumáticos estão ligados à fixação do escólex na mucosa intestinal, com um efeito irritativo directo sobre a mesma. Além disso, a eliminação dos proglótides grávidos produz manifestações clínicas como o prurido recto-anal. Por outro lado, apesar de não ser frequente, a existência de um elevado número de parasitas no lúmen intestinal pode conduzir a uma obstrução mecânica (Sánchez-Acedo et al. 1999; Bowman et al. 2009).

A acção espoliativa deriva da subtracção de nutrientes e secreções intestinais do hospedeiro, que apesar de tudo, raramente compromete o estado nutricional deles próprios, que poderá ser importante em casos de parasitismo prolongados e maciços. Além disso, têm-se observado casos de anemia grave em canídeos infectados. Os efeitos patogénicos nos animais não são tão graves como no Homem (Sánchez-Acedo et al. 1999; Bowman et al. 2009).

A infecção por céstodes adultos em canídeos é habitualmente assintomática, apesar da presença de sinais clínicos depende de diversos factores, especialmente da idade e grau de infecção, sendo mais frequente em animais jovens e em infecções maciças. Em muitas ocasiões, a observação de proglótides nas fezes ou no pêlo dos animais é o único sinal de alerta (Urquhart et al., 1996; Sánchez-Acedo et al. 1999).

O sintoma mais comum nos canídeos é o prurido anal consecutivo à irritação que provoca a saída de segmentos grávidos através do ânus, especialmente nas infecções por *D.caninum*, que faz com que o animal ande constantemente a lambar e a coçar o ânus no solo. Esta situação desencadeia alopecia, inflamações cutâneas na zona perianal e, por vezes, dermatites crónicas, assim como inflamação das glândulas anais, devido à obstrução directa dos orifícios pelos proglótides.

As infecções maciças em animais jovens podem prosseguir com sintomas inespecíficos, como a deterioração do pêlo, mau estado geral, perda de peso e diversos problemas a nível digestivo como a distensão abdominal e a presença de diarreia e/ou obstipação.

Os estudos sobre as alterações dos valores hematológicos e bioquímicos provocados por céstodes, indicam que em geral se produzem poucas trocas, e ocorrem a hipoproteinémia, hipoalbuminémia e descida da relação albumina/globulina. Estas alterações são menos

evidentes consoante o aumento da idade do hospedeiro e a duração da infecção (Sánchez-Acedo et al. 1999; Bowman et al. 2009).

Deste modo as lesões associadas são enterite crónica, especialmente no duodeno e jejuno. A mucosa aparece aumentada de tamanho, com uma intensa infiltração celular e coberta de secreção na qual se poderá observar os parasitas adultos.

#### **d) Diagnóstico**

O diagnóstico em laboratório é baseado na identificação dos proglótides, dos ovos, ou ambos, nas fezes. Convém ter em conta que a sua eliminação é irregular e variável segundo a espécie. Contudo, nas infecções por *Dipylidium* ocorre a eliminação dos proglótides com cápsulas ovíferas, pelo que raramente aparecem ovos livres, motivo pelo qual as técnicas coprológicas com exame microscópico nem sempre permitem realizar o diagnóstico a não ser que ocorra a maceração dos proglótides ou aparecem as cápsulas ovíferas na flutuação.

A detecção dos proglótides nas fezes faz-se através do exame macroscópico das mesmas. A identificação genética é importante, porque a eficácia das drogas anti-helmínticas é diferente.

As técnicas coprológicas de concentração por flutuação ou sedimentação permitem a visualização de ovos nas fezes. Uma técnica alternativa para detectar os ovos anexados na zona perianal consiste em colocar uma fita adesiva na mesma para tentar colhê-los. Os ovos de *Taenia spp* e *Echinococcus spp* são indistinguíveis ao microscópio óptico. Portanto, o diagnóstico específico é através da visualização e identificação dos parasitas adultos (Sánchez-Acedo et al. 1999).

O imunodiagnóstico constitui um método alternativo que oferece diversas vantagens sobre as técnicas coprológicas tradicionais, assim como a possibilidade de realizar o diagnóstico durante o período de pré-patência e diferenciar infecções por ténia e equinococos. A identificação de coporantígenos mediante ELISA, utilizando anticorpos policlonais frente a antígenos somáticos ou excretores/secretores é uma alternativa fiável e mais sensível (Sánchez-Acedo et al. 1999).

As técnicas baseadas na identificação de isoenzimas também são úteis para o diagnóstico de alguns céstodes, através da electroforese de extractos de parasitas frescos ou congelados. Por outro lado, a detecção de anticorpos séricos com a utilização da técnica de ELISA com antígenos de protoescólex de *E. granulosus* não permite diferenciar infecções patentes e antigas, apesar de ser útil em determinados estudos epidemiológicos para detectar a exposição dos cães domésticos ou dos silvestres, com o parasita (Sánchez-Acedo et al. 1999).

A inspecção é inevitavelmente um compromisso entre a detecção de cisticercos e a preservação do valor económico da carcaça (Urquhart et al., 1996).

Os ovos da *Taeniidae* são morfologicamente similares entre si, com dimensões que oscilam entre 29-50 × 20-35µm e são constituídos por uma oncosfera ou embrião hexacanto, rodeado por duas membranas finas, uma capa resistente de blocos de queratina denominada embrióforo e uma capa vitelina frágil (Bowman et al. 2009; Sánchez-Acedo et al. 1999).

No caso do *Echinococcus* pode-se ainda recorrer à raspagem da superfície da mucosa e colocar entre duas placas de vidro para observar em contra luz. São pequenas massas esbranquiçadas (Jenkins et al., 2005).

#### **e) Aspectos Zoonóticos**

No que diz respeito às ténias, as espécies *Taenia ovis*, *T. hydatigena*, *T. multiceps* e *T. serialis*, o homem pode ser o hospedeiro intermediário, assim como no equinococos as espécies *E. granulosus* e *E. multilocularis* são os membros mais importantes em relação à sua importância para a saúde pública e sua localização e distribuição geográfica (Jenkins et al., 2005), sendo os canídeos os hospedeiros definitivos. Pelo menos uma espécie do género equinococos ocorre em todos os continentes habitados do mundo. Neste mesmo género existem, recentemente novas áreas endémicas.

No caso do *D. caninum*, estão reportados casos excepcionais de infecção em humanos por parasitas adultos, resultantes da ingestão de hospedeiros intermediários infectados. O homem é também infectado através da ingestão de ovos (ou proglótes contendo ovos). No homem não se desenvolve a forma adulta, porque o único hospedeiro definitivo para o qual está adaptado é o cão. A infecção ocorre, então, por intermédio de fruta ou vegetais ingeridos crus ou em saladas, ou adquiridos directamente a partir do solo e água contaminados. A eclosão ocorre, por norma, apenas se os ovos forem sujeitos à acção das secreções gástricas e, seguidamente à das secreções intestinais (Sánchez-Acedo et al. 1999).

No homem, o céstode adulto pode produzir diarreia e cólicas, mas a infecção usualmente é assintomática, sendo principalmente censurável em termos estéticos (Urquhart et al., 1996).

Na cisticercose os sintomas variam consoante a sua localização e o grau de parasitose. A maior parte dos sintomas são o resultado tanto da inflamação durante a degeneração larvar como do efeito de massa do parasita. As larvas calcificadas, vivas ou mortas, não estimulam a inflamação e podem permanecer assintomáticas.

No que toca à hidatidose, no homem os quistos podem desenvolver-se em diversas zonas, posteriormente à ingestão oral dos ovos de *E. granulosus*. Esta forma é conhecida como equinococose quística primária. A sua forma secundária predomina na cavidade abdominal e resulta da ruptura, espontânea ou traumática do quisto, que por sua vez vai originar a

formação de novos pequenos quistos, que podem crescer e atingir, posteriormente, grandes dimensões.

### 3.1.3. Tremátodes

O género *Alaria* mais especificamente a espécie *Alaria alata* (Goeze, 1782) é um dos tremátodos mais frequentes e documentados em carnívoros selvagens. Pertence à família *Diplostomatidae* e apresenta como hospedeiros os caracóis e rãs, sucessivamente, e como reservatórios os ratos. Provavelmente o lobo infecta-se através da ingestão destes últimos (Balmori et al., 2000).

Pode muitas vezes ser encontrado com relativa frequência enquistada na musculatura dos suínos e sobretudo nos javalis (identificada em Salamanca e Cáceres). Os suínos infectam-se ao ingerir metacercárias presentes no segundo hospedeiro intermediário normal (girinos e rãs adultas), ou as que estão nos hospedeiros paraténicos (répteis, aves, ratos, etc.). Normalmente não ocorrem sinais clínicos (Cordero del Campillo & Arguello, 1999).

#### a) Ciclo biológico

A *Alaria alata* é um *Diplostomidae* de pequenas dimensões (2,5-6,0 × 0,5-2 mm) que invade o intestino delgado de cães, gatos, raposa, lobo, e afins na Europa e América do Norte. Em Espanha é muito pouco frequente.

No ciclo biológico os ovos não embrionados são eliminados nas fezes de um canídeo infectado. Se o ovo for depositado na água, desenvolve-se um miracídio e este eclode ao fim de 2 semanas e vai penetrar nos caracóis aquáticos até à fase de cercária, em que os abandona. Depois cada cercária que consegue penetrar na pele de um girino transforma-se numa metacercária larvar, que é limitada a espécies de *Alaria* e a alguns géneros, estreitamente relacionados. Se o girino é comido por um sapo, cobra ou um rato, a metacercária permanece nestes últimos hospedeiros até infectar um hospedeiro definitivo, como o cão ou outro hospedeiro definitivo adequado, através da ingestão por parte destes últimos. Deste modo e resumindo, as metacercárias irão enquistar (metacercária) no segundo hospedeiro (girinos e anuros adultos, e também noutros anfíbios, répteis, aves e mamíferos, incluindo o homem e os suínos), funcionando como hospedeiros paraténicos. A *Agamodistomum suis* de javalis e suínos é a metacercária de *Alaria alata*. Quando um canídeo ingere um parasita paraténico, onde depois a metacercária migra para a traqueia, depois é engolida e atinge a maturação no intestino, causando enterites catarrais quando se apresentam em grande número. Nesta fase, em que se encontra nos intestinos, emigram para as cavidades peritoneal e pleural, para

invadir os pulmões e regressar por via traqueal e faríngea ao intestino delgado, onde irá alcançar a maturidade sexual em 10-20 dias (Cordero del Campillo & Arguello, 1999).

Os ovos aparecem nas fezes 3 a 5 semanas depois da ingestão das mesocercárias pelos hospedeiros definitivos.

#### **b) Epidemiologia** (prevalências)

*Alaria alata* já foi citada em outros estudos, como exemplo, Cordero del Campillo (1994) em Cáceres e Salamanca em cães e lobo (Balmori, 2000). É o único citado em lobo na Península Ibérica e foi da responsabilidade de Balmori et al. (2000) & Segovia et al. (2001), embora com baixa prevalência relacionada com o seu carácter de baixa frequência nos canídeos (Cordero del Campillo, 1999). No entanto, Segovia et al. (2004) apresenta as seguintes prevalências 19,2% em Malcata (Portugal) e 15,8% no Sul da Espanha. Ainda em Portugal destaca o estudo feito nas Dunas de Mira, Região litoral onde se registou uma prevalência mais elevada (27,4%) deste parasita em amostras de raposas. Por fim, em Espanha, Barbosa et al. (2005) registou a presença desta tremátode em 4 das 34 províncias analisadas neste estudo.

#### **c) Diagnóstico**

O diagnóstico é feito através de técnicas coprológicas. Geralmente, as mesocercárias constituem um achado inesperado quando se realiza a inspeção triquineloscópica. No entanto, os quistos de *Alaria* encontram-se preferencialmente nos tecidos conjuntivo e adiposo interfasciculares, sobretudo nos tecidos musculares das costelas, escápula e pescoço. São visíveis à lupa, arredondados, de parede fina e aspecto vítreo, com a larva esbranquiçada e móvel.

O ovo de *Alaria* é maior que o de outros helmintes encontrados em pequenos animais (110µm) (Sloss et al., 1999), apresenta um opérculo num dos pólos e contém um embrião, cuja fase de desenvolvimento varia com a espécie em questão.

#### **d) Aspectos zoonóticos**

Este parasita é extremamente raro em seres humanos, mas é considerado um potencial agente zoonótico em todo o mundo.

O homem pode infectar-se com *Alaria alata* através do consumo de pernas de rã, insuficientemente cozinhadas. No entanto, existem mais referências de infecção por *Alaria americana*, como um caso mortal registado por Hall e Wigdor (1918), em que foi achado um

elevado número de metacercárias difundidas pelo peritoneu, fígado, pâncreas, baço, estômago, rins, pulmões, cérebro, medula espinal e gânglios linfáticos (Campillo et al., 1999). Isto remete para uma importância muito acentuada deste parasita, uma vez que este fixa-se à mucosa do intestino delgado, provocando simplesmente pequenos sinais clínicos e inespecíficos. No entanto, devido à migração da metacercária através dos pulmões e, por vezes, atravessando outros tecidos, causam doenças com sintomatologia e patologia acentuadas (Bowman et al., 2009).

Na carne, a metacercaria pode permanecer viável durante bastante tempo em refrigeração, resiste até às 8 semanas a - 20°C, pelo que ao fim de 10 dias morre em meio salgado.

Apesar do predomínio da criação intensiva de suínos, as principais fontes de infecção constituem os javalis e os suínos mantidos em pastoreio, daqui a importância de propagação deste parasita no lobo e raposa, uma vez que estes animais são uma grande fonte de alimentação destes últimos.

### **3.1.4. Coccidioses**

O desenvolvimento do nosso conhecimento sobre as coccideas em mamíferos silvestres é longo, confuso e foi, primeiramente comentado por Levine (1973), Joyner (1985) e Long e Joyner (1996).

A maioria dos mamíferos silvestres estudados estavam e estão infectados com coccideas, provavelmente ao longo das suas vidas tomam contacto com estes parasitas durante uma ou mais vezes, nomeadamente alguns coelhos e esquilos podem ser infectados durante a vida inteira com várias espécies que constantemente, desenvolvem o ciclo através destes. Dada esta frequência da coccidiose na Natureza, é provável que maior parte dos animais silvestres sejam inofensivos sob condições naturais.

Como resultado, a coccidiose é reconhecida como um grande perigo para a saúde em locais de criação intensiva de animais domésticos, em animais selvagens que estão em cativeiro (isto é, zoológicos, reprodução ou instalações de investigação), em populações de animais selvagens, quando ocorrem aglomerações populacionais, ou em espécies silvestres que têm grande potencial reprodutivo e são protegidas por leis de modo que poderá conduzir ao aumento desordenado da população em causa (por exemplo, os cangurus na Austrália) e por último a intervenção humana nas populações animais.

Ao pesquisar a literatura específica sobre animais silvestres, podemos ter um sentido da prevalência desta doença (coccidiose) em mamíferos silvestres, deste modo, destaca-se o “*Journal of Wildlife Diseases*”, que iniciou a publicação em 1965. De 1965 a 1996, foram

publicados 2830 artigos, resumos, e relatórios sobre as doenças neste tipo de animais. Todos os anos, 76 artigos (2,7%) documentaram a presença de coccídeos em animais silvestres, sendo que apenas 39 (1,3%) abordaram casos de infecções de mamíferos provocadas por coccídeos, em que 32 foram causados por *Eimeria* e *Cystoisospora* spp. e 7 por *Cryptosporidium* spp.

No caso da *Eimeria* e/ou *Cystoisospora* foram citadas infecções em pequenos mustelídeos, veados, raposas, esquilos, primatas, muflões, gambás e nos coelhos.

No caso do *Cryptosporidium* foram documentados casos em veados, raposas, gambás (experimental infecção), primatas, guaxinins, coelhos, roedores (ratos silvestres), e ruminantes. Perante isto, poucos são os casos que revelem a presença destes parasitas em lobo-ibérico.

#### **3.1.4.1. *Sarcocystis***

O *Sarcocystis* é um parasita pertencente à família *Sarcocystidae*. Do ponto de vista veterinário, os estádios importantes do género *Sarcocystis* são encontrados nos hospedeiros intermediários, como esquizontes no endotélio dos vasos sanguíneos e como quistos de bradizoítos nos músculos esqueléticos e cardíacos (Urquhart et al., 1996).

##### **a) Ciclo Biológico**

Os *Sarcocystis* têm um ciclo heteroxeno obrigatório e ao contrário do *Cystoisospora*, são esporulados quando eliminados nas fezes e contêm dois esporocistos, cada um deles com quatro esporozoítos; usualmente, o esporocisto esporulado é encontrado livre nas fezes. Isto significa que a esporogonia realiza-se no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo (Corrales & Bautista, 1999).

A esquizogonia dá-se então, no hospedeiro intermediário que podem ser ruminantes, equinos, suínos, roedores, etc. A infecção ocorre por ingestão dos esporocistos e depois é seguida de pelo menos de três gerações assexuadas. Na primeira, os esporozoítos, libertados pelos esporocistos, invadem a parede intestinal e entram nos capilares, onde se localizam em células endoteliais e sofrem dois ciclos esquizogónicos. O terceiro ciclo assexuado ocorre nos linfócitos circulantes, onde os merozoítos resultantes penetram em células dos músculos lisos e estriados. Nestes mesmos, os merozoítos enquistam e em seguida dividem-se, dando origem a amplos bradizoítos em forma de banana contidos num quisto; nesta fase forma-se então o *Sarcocystis* maduro correspondendo ao estadio infectante para o hospedeiro definitivo (Urquhart et al., 1996, Corrales & Bautista, 1999). Finalmente, ocorre a gametogonia, que tem lugar neste último, os carnívoros. A infecção dá-se por ingestão dos quistos de bradizoítos

(cistos maduros) nos músculos do hospedeiro intermediário. Os bradizoítos são libertados no intestino e depois invadem as células da lâmina própria subepitelial e diferenciam-se em micro e macrogametócitos. Após a conjugação dos gametas, formam-se oocistos de paredes finas, os quais esporulam no corpo. Formam-se dois esporocistos, cada qual contendo quatro esporozoítos. Em geral, a parede é muito fina, rompe-se e os esporocistos são encontrados nas fezes (Corrales & Bautista, 1999; Urquhart et al., 1996).

O período pré-patente é de 2 semanas, aproximadamente (Corrales & Bautista, 1999).

#### **b) Epidemiologia (prevalências)**

Nos *Sarcocystis*, assim como noutras coccidioses, pouco se conhece, mas pela alta prevalência de infecções assintomáticas observadas em matadouros, está claro que onde os carnívoros são mantidos em íntima relação com animais de interesse pecuários ou suas rações e pastagens, a probabilidade de transmissão é elevada. Deste modo, os cães pastores e os canídeos silvestres desempenham um papel muito importante na transmissão de *S. ovocanis*, e deve-se ter em atenção em dar apenas carne cozida aos cães. Os surtos agudos possivelmente têm maior probabilidade de ocorrência quando os animais são criados sem contacto absoluto com cães e de repente são expostos a grandes quantidades de esporocistos nas fezes caninas. Em qualquer das espécies não se conhece a longevidade dos esporocistos nas fezes (Urquhart et al., 1996; Corrales & Bautista, 1999).

Na Península Ibérica não se têm registado, claramente, a presença deste parasita em canídeos silvestres.

#### **c) Patogenia/Sintomas**

Nas infecções maciças dos hospedeiros intermediários há anorexia, febre, anemia, perda de peso, desconforto a nível locomotor e, às vezes, em decúbito; em cordeiros, foi descrita uma postura de cão sentado. Nos bovinos, frequentemente há perda de pêlos na extremidade da cauda. Pode ainda, ocorrer edema submandibular, exoftalmia e tumefacção de linfonodos; nas fêmeas reprodutoras há a probabilidade de sofrerem abortos (Urquhart et al., 1996).

#### **d) Diagnóstico**

A maioria das infecções por *Sarcocystis* é revelada apenas através da inspecção da carne, quando os quistos são descobertos por observação macroscópica nos músculos. Contudo, em infecções maciças dos hospedeiros intermediários, o diagnóstico baseia-se na sintomatologia e na demonstração histológica de esquizontes nos vasos sanguíneos de órgãos, como o rim ou o

coração, e na presença de quistos nos músculos durante a necrópsia ou por biópsia (Corrales & Bautista, 1999; Urquhart et al., 1996).

Um teste de hemaglutinação indirecta, utilizando bradizoitos como antigénio, também é um meio auxiliar útil para o diagnóstico, mas é preciso lembrar que a presença de um título não implica necessariamente lesões activas por este parasita. Além disso, os animais podem morrer antes de uma resposta humoral detectável (Urquhart et al., 1996).

#### **e) Aspectos Zoonóticos**

O homem é o hospedeiro final para duas espécies: *S. bovihominis* e *S. porcihominis* e estas espécies são descritas como sendo responsáveis por anorexia, náusea e diarreia.

A patologia é de dois tipos: uma rara forma invasiva com vasculite e miosite e outra que apresenta sintomatologia intestinal como náuseas, dor abdominal e diarreia. Embora suave e duradoura em 48 horas, a forma intestinal, ocasionalmente pode ser grave ou mesmo fatal. A forma invasiva pode envolver uma grande variedade de tecidos, incluindo os gânglios linfáticos, músculos e a laringe.

#### **3.1.4.2. *Cystoisospora***

O *Cystoisospora* é um género pertencente à família *Eimeriidae*, sendo principalmente parasita intracelular do epitélio do intestinal. A esquizogonia e a gametogonia ocorrem no hospedeiro e a esporulação, ou maturação do zigoto fertilizado, em geral tem lugar fora do hospedeiro. O género *Cystoisospora* contém muitas espécies e parasita uma ampla variedade de hospedeiros, principalmente animais vertebrados.

#### **a) Ciclo Biológico**

O ciclo biológico divide-se em três fases: esporulação, infecção e esquizogonia e, finalmente gametogonia e formação de oocisto.

Na esporulação os oocistos não esporulados são eliminados nas fezes. No meio ambiente em condições adequadas de oxigenação, alta humidade e temperaturas ideais, o núcleo divide-se em duas vezes e a massa protoplasmática forma dois corpos cónicos, que se irradiam de uma massa central. Cada um destes cones nucleados torna-se arredondado e forma um esporoblasto, daqui forma-se os dois esporocistos, enquanto o protoplasma no seu interior divide-se em quatro esporozoítos (Corrales & Bautista, 1999; Urquhart et al., 1996).

O tempo gasto para estas alterações varia de acordo com a temperatura, mas em condições ideais usualmente requer dois a quatro dias. O oocisto, constituído agora de uma parede

externa envolvendo dois esporocistos, cada qual contendo quatro esporozoítos, é designado por oocisto esporulado e é o estadio infectante para outros hospedeiros definitivos.

A infecção e esquizogonia correspondem à reprodução assexuada em que os hospedeiros se infectam por ingestão do oocisto esporulado. Os esporocistos são então libertados e os esporozoítos, activados pela tripsina e pela bilis, deixam o inicialmente referido. Na maioria das espécies, cada esporozoíto penetra numa célula epitelial, arredonda-se e fica conhecido como trofozoíto. Após alguns dias, cada trofozoíto terá de ser dividido, formando-se um esquizonte, uma estrutura constituída de uma grande quantidade de microorganismos nucleados alongados, conhecidos como merozoítos. Quando a divisão está completa e o esquizonte maduro, a célula hospedeira e o esquizonte rompem-se e os merozoítos saem e invadem células adjacentes. A esquizogonia pode ser repetida, e o número de gerações de esquizontes depende da espécie (Urquhart et al., 1996).

Existe a possibilidade de haver hospedeiros facultativos neste ciclo biológico como os roedores e ruminantes (cabra, vaca e búfalo), infectando-se por ingestão de oocistos de cães e gatos, não havendo multiplicação alguma, ou seja, infectam-se com estadios assexuados e actuam como reservatórios (Corrales & Bautista, 1999).

Finalmente segue-se a gametogonia com formação do oocisto (reprodução sexuada) que se inicia quando os merozoítos dão origem a gametócitos masculinos e femininos. Os factores responsáveis por esta mudança não são totalmente conhecidos. Os macrogametócitos são femininos e permanecem unicelulares, mas o seu tamanho aumenta, ocupando a célula parasitada. Os microgametócitos masculinos sofrem, cada um deles, divisão repetida e formam uma grande quantidade de organismos uninucleados flagelados, os microgametas. É somente nesta fase que as coccídias apresentam órgãos de locomoção. Os microgâmetas são libertados por ruptura da célula hospedeira, um deles penetra num macrogâmeta e ocorre, assim a fusão dos respectivos núcleos. Forma-se uma parede quística em volta do zigoto agora conhecido como oocisto e geralmente não se observa mais desenvolvimento, até que este oocisto não esporulado seja eliminado nas fezes (Urquhart et al., 1996; Corrales & Bautista, 1999).

O período pré-patente varia consideravelmente consoante a espécie, podendo ser tão curto correspondente a 9-11 dias, em alguns casos pode ir até 3 semanas, e o período patente 4 semanas (Urquhart et al., 1996; Corrales & Bautista, 1999).

Os estadios extra-intestinais podem reinvasar a mucosa intestinal e causar sintomatologia clínica (Urquhart et al., 1996).

## **b) Epidemiologia (prevalências)**

Em geral, a maioria dos animais infectados com coccídeas não manifestam sintomatologia aparente. Em caso de coccidiose clínica, associa-se sempre as condições de sobrelotação, stress, más condições sanitárias, doenças concomitantes, má nutrição e em resumo, qualquer estado de imunodepressão que predisponha ao aparecimento destes processos (Corrales & Bautista, 1999).

Certos tipos de manejo oferecem condições ideais de temperatura e humidade para a esporulação de oocistos, como a superlotação dos animais nos seus habitats, o risco de infecção maciça é ainda maior. Embora a esporulação de oocistos possa ocorrer em 2 dias depois da sua eliminação nas fezes, este período pode ser muito mais longo na pastagem. Os oocistos têm longevidade considerável e podem persistir por vários anos.

A via de contágio mais frequente para os carnívoros é a ingestão de oocistos esporulados (formas infectantes) procedentes de fezes de outros animais infectados e que contaminam o meio (Corrales & Bautista, 1999). Após a infecção, desenvolve-se imunidade e os estadios imunogénicos variam de acordo com a espécie, mas em geral são aqueles envolvidos em esquizogonia. O mecanismo de resposta não é totalmente conhecido, mas supõe-se que seja uma combinação de factores celulares e humorais. Todas as espécies deste parasita são altamente específicas para o seu hospedeiro e a imunidade para qualquer espécie é eficaz apenas para essa espécie (Urquhart et al., 1996).

Este parasita foi citado pela primeira vez em lobo na Península Ibérica com uma prevalência de 20% na Serra e Vales do Norte de Zamora (Balmorí et al., 2000).

## **c) Patogenia/Sintomas**

O *Cystoisospora* produz alterações na mucosa intestinal, cuja gravidade está relacionada com a densidade parasitária e a localização dos parasitas na mucosa. Após a ruptura das células contendo esquizontes ou gamontes, o tecido em geral recupera lentamente a sua morfologia básica (Urquhart et al., 1996; Corrales & Bautista, 1999).

Desde o ponto de vista clínico as coccidioses provocam diarreias (fezes líquidas ou pastosas) que ocasionalmente podem apresentar muco, sangue ou ambos. Outros sintomas são: vómito, perda de peso e ainda, letargia, aerofagia e desidratação, principalmente em animais mais jovens (Corrales & Bautista, 1999).

## **d) Diagnóstico**

Pode ser realizado a nível microscópico através de análises coprológicas para a observação de oocistos ou por exame de raspagem da mucosa ou cortes histológicos

Os oocistos podem ser identificados de acordo com a forma e o tamanho. As formas mais comuns variam de 15 a 50  $\mu\text{m}$ .

O tempo para que ocorra a esporulação em condições normais também pode ser usado.

#### e) Aspectos Zoonóticos

O *Cystoisospora belli* sofre o ciclo clássico das coccídias com esquizogonia e gametogonia, principalmente no epitélio intestinal. Os oocistos não esporulados medem 20-32  $\mu\text{m}$  de tamanho, contendo 2 esporoblastos e são eliminados nas fezes. Além disso, os esporozoítos são encontrados na lâmina própria e linfonodos mesentéricos. Estes são semelhantes aos que ocorrem em gatos e nos roedores, que podem servir como hospedeiros intermediários de *Cystoisospora felis* e *C. rivolta*. A presença de oocistos unicelulares sugere que a *C. belli* no homem também pode ser heteroxeno. Há uma intensa reacção inflamatória na lâmina com plasmócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e granulócitos. Na infecção crónica há atrofia biliar; diarreia intermitente, má absorção e por vezes febre.

#### 3.1.4.3) *Cryptosporidium*

Os protozoários do género *Cryptosporidium* são parasitas oportunistas, de localização intracelular (usualmente na bordadura em escova dos enterócitos), que completam o seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tractos respiratório e gastrintestinal em animais domésticos, silvestres e no homem. A primeira descrição de infecção pelo parasita do género *Cryptosporidium* foi feita por Ernest Edward Tyzzer, em 1907, que descreveu o parasitismo em glândulas gástricas de ratinhos, denominando-o *Cryptosporidium muris* (Barker & Carbonell, 1974).

O ciclo de vida deste parasita inclui uma fase assexuada, correspondendo à sua proliferação na superfície da mucosa, e reprodução sexuada associada a uma fase intracelular de desenvolvimento no seu ciclo biológico (Thompson, 2004).

O estadio de transmissão ocorre quando os oocistos se encontram nas fezes capazes de sobreviver durante muito tempo no ambiente. A re-infecção acontece quando os oocistos são ingeridos o qual poderá acontecer através do contacto directo ou ainda através da água, comida e/ou artrópodes infectados com o parasita (Hunter & Thompson, 2005).

Este parasita em conjunto com a *Giardia*, é o mais comum dos parasitas entéricos em humanos e animais domésticos e tem sido reconhecido como parasita de extensa variedade nas espécies selvagens (Thompson, 2004; Thompson and Monis, 2004).

Nestes últimos anos, a criptosporidiose tem tido grande importância, estando associada à Síndrome da Diarreia Neonatal em espécies de importância económica, assim como podem ser transmitidas para a espécie humana (Hunter & Thompson, 2005).

Deste modo, a Criptosporidiose é uma doença gastrointestinal de mamíferos causada pelo parasita do grupo Apicomplexa, nomeadamente, *Cryptosporidium parvum*. Outras espécies deste parasita existem numa grande variedade de animais vertebrados, mas o *C. parvum* é o responsável por induzir a doença nos humanos e em outros mamíferos (Bowman et al., 2009). O papel dos mamíferos selvagens na epidemiologia deste parasita no Homem é, ainda pouco entendida (Duncan, 1999).

#### **a) Ciclo biológico**

O estadio de transmissão corresponde aos oocistos infectantes (5 a 8 µm de diâmetro, dependendo da espécie) que contêm 4 esporozoítos que são excretados pelo hospedeiro infectado através das fezes ou de secreções respiratórias. Os oocistos permanecem viáveis durante meses, a não ser que sejam expostos a temperaturas extremas (abaixo dos 0°C e acima de 65°C), dissecação ou a desinfetantes muito concentrados (5% amónia e 10% formalina) (Bowman et al., 2009). A transmissão de *Cryptosporidium parvum* e *C. hominis* ocorre principalmente, através do contacto com água contaminada e ocasionalmente, através da comida. Após a ingestão (ou possivelmente inalação) pelo hospedeiro, os oocistos abrem pela linha de sutura preexistente, libertando os esporozoítos que, por sua vez, se instalam nas células epiteliais do tracto gastrointestinal, na bordadura em escova das microvilosidades das glândulas gástricas (*C. muris*; Tyzzer, 1907) ou metade da parte inferior do intestino delgado (*C. parvum*; Tyzzer, 1912) e, ainda, de outros tecidos, como o tracto respiratório. Nestas células ocorre multiplicação assexuada (esquizogonia e merogonia) e posteriormente a multiplicação sexuada, gametogonia, produzindo microgamontes (macho) e macrogamontes (fêmea). Uma vez, realizada a fertilização, formam-se os oocistos que esporulam no interior do hospedeiro infectado.

Estudos recentes indicam também que são produzidos dois tipos de oocistos. No primeiro tipo de oocisto, cuja maioria tem as paredes espessas e são eliminados nas fezes. Os restantes têm paredes finas e libertam os esporozoítos no intestino, causando auto-infecção (Urquhart et al., 1996). Os oocistos são infectantes após a sua excreção pelo hospedeiro, permitindo que ocorra directa e imediatamente a transmissão fecal-oral.

O período pré-patente da criptosporidiose pode variar, de acordo com a espécie, a idade do hospedeiro, a estirpe do parasita e factores de transmissão (Fonseca, 2000).

### b) **Epidemiologia** (prevalências)

A criptosporidiose já foi referida em mais de cento e setenta espécies diferentes de hospedeiros, oriundos de cerca de cinquenta países, localizados em zonas tropicais e temperadas (O'Donoghue, 1995).

Os factores biológicos que afectam a epidemiologia do género *Cryptosporidium* são: eliminação de pequenos oocistos esporulados, a resistência às condições ambientais e a transmissão directa de um hospedeiro a outro, a natureza ubiquitária capaz de causar infecções cruzadas em múltiplas espécies, as doses infectantes são muito reduzidas, apresentam uma capacidade de multiplicação até um elevado número num único hospedeiro animal e ainda, apresentam uma elevada resistência aos desinfectantes e a vários fármacos (Fonseca, 2000).

Em animais domésticos, silvestres e em cativeiro estão descritas infecções naturalmente adquiridas. A maioria está associada a *C. parvum* ao contrário do pequeno número atribuído a *C. muris*. Também é importante realçar a susceptibilidade deste parasita para os animais jovens e a mortalidade significativa em recém-nascidos.

No geral, as prevalências de *Cryptosporidium* nas fezes de ovinos tem sido 41% no Rio de Janeiro, em Espanha 15% (Matosfernandes et al., 1994), Canadá 24% (Olson, 1997) e Polónia 10% (Majewska, 2000); porém bem menores que os 77% verificados nos Estados Unidos por Santín et al. (2007) (Ducan, 1999).

Os ruminantes selvagens em jardins zoológicos, também têm-se mostrado comumente infectados com *C. parvum* (Heuschele, 1986) assim como os guaxinins (*Procyon procyon*) (Carlson, 1982; Snyder, 1988), raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) (Davidson, 1992), esquilo cinzento (*Sciurus carolinensis*) (Sundberg, 1982), ratos de algodão (*Sigmodon hispidus*) (Elangbam, 1993), e morcegos (*Eptesicus fuscus*) (Dubey et al. 1998) e ainda a referência do caso de criptosporidiose documentado num filhote de urso negro (*Ursus americanus*) da América do Norte (Ducan, 1999).

Os resultados dos estudos epidemiológicos vêm certamente apoiar a hipótese de que *C. hominis* é transmitida apenas entre seres humanos, mas que o grande reservatório para *C. parvum* é o gado doméstico, em que o contacto directo com animais infectados constitui o principal meio de transmissão, juntamente com a transmissão indirecta através da água potável.

### c) **Patogenia/Sintomas**

A patogenia da infecção por *Cryptosporidium* não está muito clara. Os equizontes e gamontes desenvolvem-se num invólucro parasitóforo aparentemente derivado das microvilosidades e,

assim sendo, provavelmente não ocorre a ruptura celular, observada noutras coccídeas. Ocorrem também, alterações da mucosa do íleo, onde há atrofia, intumescimento e eventualmente fusão das vilosidades; isto conduz a um efeito marcante sobre a actividade de algumas enzimas ligadas à membrana (Urquhart et al., 1996).

A principal manifestação clínica da criptosporidiose em humanos, caracteriza-se pela diarreia aquosa e profusa, associada a sintomas menos comuns como: cólicas, dor abdominal, febre ligeira, náuseas, vômito, fadiga, dor de cabeça, mialgia e anorexia (O'Donoghue, 1995).

A duração da diarreia depende do estado imunitário do hospedeiro. Normalmente, a duração vai de poucos dias a poucas semanas nos hospedeiros imunocompetentes, contrastando com os casos de imunodeprimidos em que poderá durar meses e anos, o que pode comprometer a vida do paciente.

#### **d) Diagnóstico**

Os sinais clínicos e a patogenia da infecção por *Cryptosporidium parvum* são pouco específicos e conseqüentemente insuficientes para chegar a um diagnóstico definitivo. Deste modo, devido a este factor e ao carácter deste trabalho assim torna-se indispensável recorrer a técnicas laboratoriais.

O pequeno tamanho dos oocistos do género *Cryptosporidium* dificulta o diagnóstico, considerando a espécie mais comum – *C. parvum*, em que os oocistos têm em média  $5,0 \times 4,5$   $\mu\text{m}$  em forma oval ou elíptica e quatro esperozoítos nus, sem esporocistos. Uma outra espécie, também com importância em mamíferos – *C. muris*, apresenta dimensões médias de  $7,4 \times 5,6$   $\mu\text{m}$  (Fonseca, 2000).

De maneira geral, várias técnicas têm sido utilizadas para facilitar o diagnóstico deste parasita com aparecimento dos oocistos nas fezes, aproveitando que estes têm características álcool-ácido-resistentes. Por norma, as amostras fecais são conservadas em dicromato de potássio a 5% em partes iguais. A conservação em formol a 10% ou em solução de acetato de sódio, ácido acético e formalina, torna os oocistos inviáveis.

A principal metodologia de diagnóstico utilizada é a que permite a identificação da presença de oocistos nas fezes, sem a determinação da espécie de *Cryptosporidium* envolvida. Este facto deve-se a duas razões principais: a facilidade dos procedimentos laboratoriais e o baixo custo, quando comparados a metodologias mais elaboradas, como a reacção da Polimerase em cadeia (PCR). Essa identificação pode ser realizada mediante técnicas de coloração de esfregaços fecais em lâminas de vidro ou por técnicas de exames a fresco.

As técnicas de coloração são variadas, sendo que as técnicas mais utilizadas actualmente são as de Ziehl-Neelsen e suas variantes, que compreendem os métodos de Kinyoun modificado a

frio, Ziehl-Neelsen modificado a quente, Safranina modificada a quente, Ziehl-Neelsen-Dimetilsulfóxido entre outros (Barwick et al., 2000), como é o caso do Giemsa, por Gram, pelo azul metileno e etc.

A coloração de esfregaços de fezes permite um diagnóstico fácil e rápido para a detecção de oocistos nas fezes, porém, nem sempre este método é o mais sensível, principalmente considerando-se que os animais assintomáticos podem eliminar poucos oocistos, pois o sucesso no diagnóstico dependerá sempre da presença e da quantidade de oocistos no esfregaço fecal, que também está relacionado com o estado da amostra (Huber et al., 2004). Está descrito que somente se conseguem detectar oocistos, por estas técnicas, em amostras de fezes que contenham um número superior a  $1 \times 10^3$ - $10^4$  oocistos/mL ou mais (Peeters & Villacorta, 1995 in Fonseca, 2000). No entanto, várias técnicas de sedimentação e de flutuação foram desenvolvidas, para incrementar a concentração e a recuperação de oocistos em amostras de grande volume (Fonseca, 2000).

Neste trabalho os oocistos foram observados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada, que irá ser descrita em pormenor mais à frente neste trabalho, em que os esporozoítos aparecem como grânulos rosa-avermelhados, num fundo verde-azulado, correspondendo aos artefactos fecais. Nalguns casos, são necessárias mais do que uma técnica para se conseguir o diagnóstico da criptosporidiose, o que o torna demorado e dispendioso. Devido a estes motivos é que só efectuei a imunofluorescência com anticorpos monoclonais em poucas amostras. Esta técnica de coloração mais sofisticada permite um diagnóstico mais preciso e esclarecedor.

#### **e) Aspectos Zoonóticos**

A importância da criptosporidiose em humanos foi inicialmente reconhecida como uma oportunista em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), porque um grande número de casos foram observados em hospedeiros com esta síndrome (O'Donoghue, 1995), mas o impacto de tais infecções agora está a diminuir, pelo menos nos países desenvolvidos, com o advento das terapias retrovirais. No entanto, o interesse pela criptosporidiose humana remonta a início dos anos 1980. Naquele tempo, a criptosporidiose foi considerada uma doença zoonótica muito patogénica, mas com o potencial de transmissão de pessoa para pessoa (Casemore et al., 1985). Essa visão teve origem na investigação de surtos de infecção, que eram geralmente associados com visitas a explorações e jardins zoológicos ou através da contaminação da água potável, que se acredita ser em grande parte devido à contaminação por animais. *C. parvum* não era afinal uma única espécie homogénea com epidemiologia bastante idêntica, mas sim dois tipos relacionados, um dos quais era um agente patogénico estritamente humano e outro principalmente zoonótico. Esta observação foi

logo confirmada por vários outros grupos de pesquisa com acesso a colecções de amostras maiores e mais diversificadas e também em estudos experimentais (Morgan et al., 1998; McLauchlin et al., 1998, 1999; Homan et al., 1999).

A principal manifestação clínica da criptosporidiose em humanos caracteriza-se pela diarreia aquosa e profusa. A duração desta depende do estado imunitário do hospedeiro. A transmissão da criptosporidiose em humanos, está associada a águas de bebida contaminadas (MacKenzie et al., 1994). Para melhor entender o potencial zoonótico de infecção do *Cryptosporidium* nos animais domésticos e silvestres, é importante determinar se os humanos e os animais são susceptíveis de se infectarem com as formas geneticamente idênticas deste parasita (Hunter & Thompson, 2005).

A taxonomia do *Cryptosporidium* tem sido extensivamente revista, o que também constitui importantes bases para compreender a ligação entre as infecções no homem e outros animais. No entanto, tem sido muito difícil aprofundar esta questão devido à escassez das características morfológicas que permitem discriminar as espécies (Hunter & Thompson, 2005).

Num estudo realizado sobre criptosporidiose em pacientes na Escócia, o *C. parvum* foi mostrado como sendo o agente causal em 84% dos 67 casos suspeitos, em resposta foram implementadas medidas de apoio ao gado face à poluição fecal nas fontes de água considerada a principal causa de casos esporádicos de criptosporidiose em humanos (Goh et al. 2004 in Hunter, 2005).

A infecção por *Cryptosporidium* pode causar debilitação e doença gastrointestinal, que pode ser fatal em hospedeiros imunodeprimidos (Shukla et al., 2006).

### **3.2. Parasitas Pulmonares**

Os parasitas pulmonares (nemátodes) são conhecidos como os principais agentes de infecções e lesões vasculares nos pulmões. Estes parasitas são isolados dos carnívoros domésticos e silvestres, constituindo importantes achados destes parasitas em canídeos em Portugal. Deste modo, as quatro espécies de parasitas que mais se registam nestes mesmos animais são: *Angiostrongylus vasorum*, *Filaroides martis*, *Crenosoma vulpis* e *Eucoleus aerophilus* (Madeira de Carvalho et al., 2009). O nemátode *Angiostrongylus vasorum* é um parasita em crescente preocupação em várias partes do mundo, uma vez que causa doenças significativas em cães. Os canídeos silvestres, especialmente as raposas, são susceptíveis de ter um papel importante na epidemiologia da infecção canina, afectando a saúde das raposas e a sua dinâmica.

No género *Angiostrongylus vasorum* têm sido identificados em quase todos os estudos efectuados na Europa, nomeadamente em Portugal. Em países, como na Inglaterra, a sobreposição geográfica da distribuição deste parasita nas raposas e nos cães não indica necessariamente, que a primeira represente um importante reservatório de animais silvestres da infecção, mas sugere que o *A. vasorum* pode estar a dispersar-se na Natureza. Num estudo efectuado ao coração e vasculatura pulmonar de 546 raposas em 2005-2006, examinadas por dissecação, resultou numa prevalência geral na população de raposa do Reino Unido de 7,3% (5,3-9,9). A prevalência variou muito entre as regiões, de 0% (0-3) na Escócia e norte da Inglaterra a 23% (16-32) no sudeste da Inglaterra. As lesões são mais confinadas às partes ventrais dos lobos pulmonares que normalmente, apresentam pneumonia granulomatosa. A hipertrofia do ventrículo direito do coração está frequentemente, presente em todas as raposas infectadas, sugerindo que o parasita pode afectar a saúde da raposa e condição corporal (Morgan et al., 2008). Acredita-se, portanto, que a população de raposa representa um importante reservatório de *A. vasorum*.

Em várias localidades de Galicia, em Espanha, não muito longe de algumas localidades em estudo neste trabalho, também já foram encontradas algumas espécies de parasitas do coração e pulmão em treze espécies hospedeiras pertencentes às ordens Rodentia, Carnivora Insectivora. Como resultado nos canídeos silvestres foram encontradas as seguintes espécies: *Angiostrongylus vasorum*, *Crenosoma vulpis* e *Eucoleus aerophilus* (3, 3.46 e 0.50%, respectivamente) (Alvarez et al., 1991).

No entanto, apesar destas prevalências, neste trabalho tendo em conta o tipo de amostras, os métodos laboratoriais aplicados e as espécies em causa e só irei aprofundar o género *Eucoleus*, sendo este também o único encontrado relativamente aos referidos.

O género *Eucoleus* é um parasita capilariforme, muito fino com 1 a 5 cm de comprimento, não facilmente visíveis a olho nú. A nível morfológico apresentam um esófago estreito, ocupando metade da extensão do corpo. Os machos possuem um único espículo longo e fino, e frequentemente uma estrutura primitiva semelhante a uma bolsa copuladora; as fêmeas contêm ovos que se parecem com os de *Trichuris*, por apresentar opérculos bipolares, mas que têm mais formato de barril e são incolores (Urquhart et al., 1996; Bowman et al., 2009).

Este género apresenta, então um variado número de hospedeiros e locais de preferência, além do facto de alguns terem ciclo evolutivo directo e outros indirectos (Urquhart et al., 1996; Bowman et al., 2009).

Actualmente as espécies encontradas em canídeos têm sido agrupadas em três géneros, pertencentes à superfamília *Trichinelloidea*: *Eucoleus* para os que se encontram nas vias

aéreas, *Aonchotheca* para os parasitas que se localizam no tracto intestinal e *Pearsonema* para os que ocorrem na bexiga. Os que são encontrados no fígado dos ratos e outros hospedeiros têm sido caracterizados no género *Calodium* (Bowman et al., 2009).

Dado os objectivos deste estudo, dentro do género *Eucoleus* apenas será referida, posteriormente a espécie *E. aerophilus* de forma muito breve e resumida, uma vez que representa a espécie mais importante, dada a sua frequência no nosso país.

#### **a) Ciclo Biológico**

O *Eucoleus aerophilus* (Creplin, 1839) é um parasita pulmonar de diversos carnívoros da Península Ibérica e noutras partes do mundo (Miquel et al., 1994). É encontrado inserido na mucosa da traqueia dos brônquios e das vias nasais de raposas e, ocasionalmente, de cães e gatos. O parasita pode ter ciclo evolutivo directo ou pode envolver minhocas como hospedeiros intermediários facultativos (Bowman et al., 2009), comendo os ovos *E. aerophilus* e infectando hospedeiros mamíferos. Os ovos podem sobreviver durante meses e quando um hospedeiro adequado comer estes ovos maduros, as larvas eclodem e penetram no intestino e migram para os pulmões através da circulação sanguínea. Uma vez nos pulmões, os parasitas adultos colocam ovos que por sua vez são deglutidos pelo mesmo hospedeiro quando este tosse e ao engolir passam pelo sistema digestivo até aparecerem nas fezes do mesmo hospedeiro. No solo, em cerca de 5-7 semanas, as larvas desenvolvem-se para a fase infecciosa dentro do envelope dos ovos (Urquhart et al., 1996). As larvas infectantes permanecem viáveis no ambiente até 1 ano.

#### **b) Epidemiologia (prevalências)**

Neste estudo pelo método coprológico aplicado e pelas espécies em causa, como já foi referido, só foi encontrado o *Eucoleus aerophilus* apesar de ser considerado um parasita com pouca prevalência em carnívoros domésticos. *E. aerophilus* só foi observado uma vez no verão 2004 com 1,1% de prevalência anual e uma média de 0,3% de prevalência entre 1999-2008 (Madeira de Carvalho et al., 2009). Nos carnívoros silvestres tem-se registado o contrário, os parasitas pulmonares têm sido isolados com mais frequência nestes animais, p.e. raposa-vermelha (*Vulpes vulpes silacea*, Miller, 1907) (Madeira de Carvalho et al., 2009).

A estabilidade do nível de infecção é uma característica em alguns lugares na Europa, onde a prevalência nas raposas é tipicamente entre 35 e 65% (Manas et al., 2005 in Madeira de Carvalho, 2008). No entanto, o parasita parece ser muito comum na Dinamarca com 74% de prevalência (Saeed et al., 2006) e Noruega com 88% (Davidson et al., 2006).

No presente estudo, não foi possível fazer a relação entre estações, como já foi referido, mas segundo alguns estudos não existe grande relação entre a estação e o risco de infecção. Isto poderia ser explicado pela falta de sazonalidade na transmissão, longevidade do parasita, que excede o período pré-patente, ou atenuação dos efeitos sazonais, por exemplo, dependência de densidade ou imunidade. O *E. aerophilus* tem sido encontrado com mais frequência no sexo masculino do que no feminino em raposas, em consonância com as teorias da deficiência imunológica em mamíferos do sexo masculino (Wilson et al., 2002).

A disseminação das raposas nas áreas urbanas dos países europeus e a alta prevalência de parasitas pulmonares e da bexiga, como o *Pearsonema plica* neste carnívoro, pode aumentar a prevalência destes nemátodes em cães e gatos domésticos (Sréter et al., 2003).

### **c) Patogenia/Sintomas**

As lesões patológicas associadas a parasitas pulmonares são descritas e comparadas às lesões notificadas de infecção pelos mesmos parasitas em cães. No entanto as lesões observadas nas raposas parecem ser menos graves (Poli et al., 1991).

O *Eucoleus aerophilus* como parasita pulmonar é considerado um agente causador de pneumonia/broncopneumonia e de lesões vasculares pulmonares em carnívoros domésticos, associadas ou não, com infecção bacteriana secundária (Madeira de Carvalho et al., 2009). A lesão das vias aéreas poderá ainda conduzir a uma rinitis e à oclusão dos pequenos brônquios e bronquíolos, com a consequente manifestação de tosse, espirros e corrimento nasal associado a taquipneia. As raposas podem ficar emaciadas, com pele de baixa qualidade. Nas raras infecções agudas, pode haver alta mortalidade. Os efeitos causados por cargas parasitárias elevadas foram descritos em raposas, como podendo levar então, ao desenvolvimento de pneumonia (Christensen, 1938 in Pence & Custer, 1981).

A maioria dos registos do *E. aerophilus* em animais silvestres são simplesmente levantamentos de campo do parasita, e não mencionam sintomas específicos. No entanto, há um registo de um importante envolvimento da infecção por parte deste parasita que levou à morte de um gambá, um marsupial típico das Américas (Pence & Custer, 1981).

### **d) Diagnóstico**

A natureza da sintomatologia é inespecífica e nas infecções maciças, as manifestações clínicas aparecem antes que haja ovos nas fezes. No entanto, o diagnóstico é baseado na identificação de ovos nas fezes ou no muco traqueal, com formato gordo, redondos, muitas vezes assimétricos e bipolares (Bowman et al, 2009).

Contudo, os cães e gatos raramente desenvolvem um grau severo de infecção que se observa em raposas de cativeiro (Bowman et al, 2009).

#### e) Aspectos Zoonóticos

Em humanos poucos são os casos em que ocorrem infecções causadas por estes parasitas, há somente alguns casos identificados na Europa, no Irão e Marrocos. Os sintomas incluem tosse, febre, bronquite, dispneia (falta de ar), sangue na saliva, e níveis elevados de eosinófilos no sangue (eosinofilia) (Saeed et al., 2006).

### 3.3. Parasitas Musculares

#### 3.3.1. *Trichinella*

O género *Trichinella* (Railliet, 1895) engloba parasitas do tecido muscular e que pertencem à superfamília *Trichinelloidea*. Actualmente, já foram identificados 12 genótipos no género *Trichinella* (8 dos quais ao nível da espécie): *T. spiralis* (Owen, 1835), a nórdica *T. nativa* (Britov e Boev, 1972), a africana *T. nelsoni* (Britov e Boev, 1972), a euroasiática de climas temperados *T. britovi* (Pozio e col., 1992), *T. murrelli* e os genótipos *Trichinella* T6, T8, T9 e T12. E ainda, as espécies não quísticas a *T. pseudospiralis* (Garkavi, 1972) que infecta indistintamente aves e mamíferos, a *T. zimbabwensis* e a *T. papuae*, (Pozio et al., 2009).

Os machos têm cerca de 1 mm de comprimento. O esófago corresponde, no mínimo a um terço do comprimento total do corpo e a cauda tem duas pequenas asas cloacais, mas nenhum espículo. A fêmea tem 3 mm de comprimento e o útero contém larvas em desenvolvimento. A infecção por *Trichinella* é mais facilmente identificada pela presença de larvas enroladas na musculatura estriada (Martinez-Fernandez, 1999; Urquhart et al., 1996).

**Tabela 1:** Correspondência das diferentes espécies e genótipos de *Trichinella* com as respectivas localizações e hospedeiros (Gottstein et al., 2009).

Espécies	Área Geográfica	Hospedeiros principais
<b>QUÍSTICA</b>		
<i>T. spiralis</i>	Cosmopolita	Animais sinantrópicos omnívoros e mamíferos domésticos e silvestres
<i>T. nativa</i>	Áreas do Ártico e subártico da América, Ásia e Europa	Carnívoros silvestres terrestres e marinhos
<b>Genótipo T6</b>	Canadá e Estados Unidos	Ursos e carnívoros silvestres
<i>T. britovi</i>	Zonas temperadas da Europa e Ásia, norte e oeste de África	Mamíferos silvestres e suínos domésticos
<b>Genótipo T8</b>	África do Sul e Namíbia	Carnívoros silvestres
<i>T. murrelli</i>	Estados Unidos e Canadá	Carnívoros silvestres
<b>Genótipo T9</b>	Japão	Carnívoros silvestres
<i>T. nelsoni</i>	África oriental, África ao sul do Sahara	Felídeos, canídeos e outros carnívoros silvestres e omnívoros (suínos)
<b>Genótipo T12</b>	Argentina	Carnívoros silvestres
<b>NÃO QUÍSTICAS</b>		
<i>T. pseudospiralis</i>	Cosmopolita	Aves de rapina, corvídeos, mamíferos silvestres e suínos domésticos
<i>T. papuae</i>	Nova Guiné, Tailândia	Suínos domésticos e silvestres e crocodilos
<i>T. zimbabwensis</i>	Etiópia, Moçambique, África do Sul, Zimbábue	Crocórdilos, felídeos e lagartos

#### a) Ciclo Biológico

O ciclo biológico da *Trichinella* é um ciclo directo com carácter auto-heteroxeno, ou seja, o mesmo animal alberga formas adultas e larvares: o intestino funciona como hospedeiro definitivo, o sistema circulatório e o tecido muscular como hospedeiro intermediário e paraténico. O ciclo repete-se tantas vezes, uma vez que um hospedeiro é ingerido por outro da mesma ou de espécie diferente. Para as espécies de hospedeiro que albergam as formas quísticas só a temperatura limita o desenvolvimento do parasita no músculo, como se regista num anfíbio ou réptil, que mantêm uma temperatura corporal de 38°C (Martinez-Fernandez, 1999).

O ciclo e a vida deste nemátode é fundamentalmente endocelular, primeiro passa por uma fase intestinal e depois muscular (Martinez-Fernandez, 1999).

A infecção inicia-se quando as larvas são ingeridas por um hospedeiro, normalmente como resultado de predação, consumo de cadáver ou mesmo consumo de fezes de um carnívoro com carne mal digerida. Devido à acção do suco gástrico na digestão, as L<sub>1</sub> são libertadas no intestino onde depois cada uma invade os enterócitos. A este nível sofrem quatro mudas, tornando-se sexualmente maduras em 2-3 dias. Uma vez, na fase adulta ficam entre as

vilosidades do intestino delgado. Após a fertilização, os machos morrem, enquanto as fêmeas invadem mais profundamente as vilosidades. Passados 3 dias formam-se as L<sub>1</sub>, que posteriormente entram nos vasos linfáticos e, através da circulação sanguínea, seguem e alojam-se nos músculos esqueléticos.

No decorrer desta fase as larvas podem atingir, transitoriamente ou não, o coração, pulmões, cérebro, rins, fígado ou outros órgãos antes de atingirem as células musculares estriadas (Bowman et al., 2009; Martinez-Fernandez, 1999; Urquhart et al., 1996).

Os músculos mais parasitados são os que possuem maior actividade, deste modo, os músculos mais afectados são o diafragma, a língua, os masséteres, os intercostais, os bicípedes, os tricípedes, flexores e os extensores do carpo e tarso. As fibras musculares lisas raramente são parasitadas (Bowman et al., 2009; Martinez-Fernandez, 1999; Urquhart et al., 1996).

Na fase muscular, ainda como L<sub>1</sub>, as larvas penetram nas células musculares, onde são encapsuladas pelo hospedeiro, crescem e adoptam uma posição enrolada em espiral muito característica. Este processo completa-se em sete semanas, altura em que as larvas são infectantes, podendo assim permanecer durante anos (Bowman et al., 2009; Martinez-Fernandez, 1999; Urquhart et al., 1996).

**Tabela 2:** Correspondência dos diferentes estados morfológicos da *Trichinella* sp com a sua localização no ciclo biológico (Martinez-Fernandez, 1999).

<b>Estado morfológico</b>	<b>Localização</b>
<b>Juvenis (L<sub>1</sub> – L<sub>5</sub>)</b>	Enterócitos
<b>Adultos</b>	Lúmen intestinal
<b>Embriões</b>	Circulação linfática e hemática
<b>Larvas musculares</b>	Quistos e músculo estriado

#### **b) Epidemiologia** (prevalências)

Actualmente, nas regiões da Europa do sul e Central, a Triquinelose silvática tem uma maior prevalência nas raposas cujo habitat se situa nas áreas protegidas ou nas regiões onde a influência humana não interferiu com o ciclo de transmissão baseado na necrofagia e canibalismo, como já foi referido (Pozio, 1995, 1998 in Magalhães, 2003). Em contrapartida, nas áreas cuja altitude é mais baixa a prevalência é mais reduzida provavelmente devido ao maior impacto dos humanos no ambiente, o que desencoraja a vida silvestre (Pozio, 1998 in

Magalhães, 2003). Assim, parece haver uma relação inversa entre a densidade populacional e a presença do ciclo silvático.

A *Trichinella spiralis* e *T. britovi* são as duas espécies mais comuns deste parasita que circulam na Europa. Com base nos dados fornecidos ao Centro Internacional de Referência da *Trichinella* de ao longo dos últimos 20 anos (dados referentes a 540 isolados de *T. spiralis* e 776 isolados de *T. britovi*), foi possível descrever as espécies hospedeiras e as características do habitat para estas duas espécies na Europa (Pozio et al., 2009).

Na maioria dos países, o *T. britovi* é mais difundido (62,5-100% dos isolados) do que *T. spiralis* (0,0-37,5%), embora, na Finlândia, Alemanha, Polónia e Espanha, *T. spiralis* é mais prevalente (56,3-84,2% dos isolados) (Pozio et al., 2009).

A *Trichinella britovi* é mais difundida do que *T. spiralis* em carnívoros silvestres (89% versus 11%), enquanto *T. spiralis* é prevalente em suínos selvagens (62% versus 38%) e domésticos (82% versus 18%), bem como em roedores (75% versus 25%). A *Trichinella spiralis* e a *T. britovi* circulam nos mesmos ambientes: 41,1% e 46,0%, respectivamente, em áreas agrícolas, e 45,5% e 46,6% em florestais e áreas semi-naturais (Pozio et al., 2009).

Os outros dois agentes etiológicos que circulam na Europa são a *Trichinella nativa* e a *T. pseudospiralis* que desempenham um papel secundário como parasitas mais patogénicos do género *Trichinella* (Pozio et al., 2009).

Na Península Ibérica, há uma prevalência constante de *Trichinella* com intensidade variável. A triquinelose é endémica, basicamente devido aos sistemas de exploração suína e hábitos alimentares, os focos deste parasita em humanos na Galiza e Portugal são pouco frequentes. Desde que, em 1976 se isolou num lobo na Galiza, sabe-se que entre a fauna selvagem da Península Ibérica, circulam duas espécies diferentes, morfologicamente indistinguíveis e isoladas reprodutivamente. Hoje sabe-se que a *T. britovi* e a *T. spiralis* são espécies autóctones (Martinez-Fernandez, 1999).

Na epidemiologia da triquinelose suína em Espanha fazem parte as variedades urbanas, rurais e silvestres.

Em Portugal Continental (Minho, Trás-os-Montes e Beira Interior), a triquinelose silvática está bem disseminada com carácter de endemicidade na população de mamíferos da ordem Carnívora. O principal reservatório da *Trichinella* spp. é a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes silacea*), este hospedeiro assume maior relevância, quer pela dimensão da sua população, quer pela sua distribuição no território. Outros mamíferos pertencentes à ordem Carnívora, nomeadamente, o lobo (*Canis lupus*) e a lontra (*Lutra lutra*), também são portadores de *Trichinella* spp. No entanto, desempenham um papel secundário na epidemiologia da Triquinelose (Magalhães, 2003).

Os canídeos são os que apresentam prevalências mais elevadas, particularmente os lobos e as raposas, com maior intensidade quando são verdadeiramente silvestres, ou seja, longe de populações humanas e aterros não controlados (Martinez-Fernandez, 1999).

Muitas espécies de mamíferos, aves, répteis, peixes e invertebrados podem ser portadores deste parasita nas zonas climáticas mais diversas. A sua grande distribuição geográfica está, muito provavelmente, relacionada com a ausência de desenvolvimento externo e a sua adaptação a condições climáticas rigorosas (Martinez-Fernandez, 1999).

Somente no início do século XX, na Alemanha, se colocou a hipótese da existência da Triquinelose silvática com um ciclo independente do homem e dos animais domésticos (Pozio, 2000). Mais tarde, Campbell (1983) identificou dois ciclos, doméstico e silvático, demonstrando as suas interligações. Em ambos os ciclos, o homem é sempre um hospedeiro acidental deste parasita.

O ciclo doméstico consiste na transmissão da infecção por *Trichinella spp.* entre os animais domésticos (porco, cavalo, cão e gato) e sinantrópicos (sobretudo roedores), ou seja, que dependem do homem e da sua cultura zootécnica. Os roedores e os suínos são os principais hospedeiros.

Este ciclo ainda pode dividir-se em duas variedades: urbana e rural. Na urbana o principal agente infectante é *T. spiralis*, e desenrola-se entre os suínos domésticos e animais sinantrópicos. No entanto, as espécies selvagens de *Trichinella* podem ser transmitidas aos animais domésticos, quando estes contactam com fauna silvestre. Esta procedimento estende a *T. spiralis* ao estado selvagem, assim como pode levar à infecção por *T. britovi* ao homem. (Navarrete et al., 1991; Euzeby, 1994; Pozio et al., 1996; Martinez-Fernandez, 1999; Pozio, 2000, 2001; European Commission, 2005).

O ciclo silvático abrange diversos padrões de transmissão, cada um relacionado com um genótipo específico de triquinela. Além disso, a domesticação de animais, as alterações dos habitats naturais e conseqüentemente o desenvolvimento de novos nichos ecológicos, tornaram mais complexa a epidemiologia desta zoonose. Todos os mamíferos selvagens são potenciais hospedeiros de triquinela, realçando os principais reservatórios que são os carnívoros selvagens com comportamentos de canibalismo e necrofagia. Dentro deste ciclo as espécies variam consoante a região climática considerada e área geográfica (Murrell e Pozio, 2000 em Martinez-Fernandez, 1999).

Conseqüentemente, define-se que a triquinela está, então presente nas famílias de mamíferos, nomeadamente: *Canidae*, *Hyaenidae*, *Procyonidae* e *Ursidae*. Não obstante, as famílias *Felidae* e *Mustelidae* também podem estar infectadas (Martinez-Fernandez, 1999).

### **c) Patogenia/Sintomas**

A infecção nos animais domésticos é normalmente leve e não ocorre sintomatologia clínica. Entretanto, quando são ingeridas centenas de larvas, como ocasionalmente acontece no homem e provavelmente também em animais predadores, a infecção intestinal costuma estar associada a enterite, e depois a invasão larvar maciça dos músculos causa miosites agudas, febre, eosinofília e miocardite (Martinez-Fernandez, 1999). No homem também são comuns os sintomas de edema e ascite (Urquhart et al., 1996). Os edemas palpebrais são raros. Na fase pseudoreumática febril, bem como mialgia e artralgia, dificilmente observáveis, há eosinofilia e o aumento da fosfocreatina (Martinez-Fernandez, 1999).

### **d) Diagnóstico**

O diagnóstico nos animais domésticos vivos não é relevante. À inspecção de carne, ocasionalmente podem ser vistas a olho nú, infecções larvares maciças, como minúsculas manchas brancas acinzentadas (Bowman et al., 2009).

O método de digestão de amostras combinadas, utilizando um agitador magnético é recomendado como um método fiável para utilização de rotina. A dimensão das amostras para análise de parasitas deve ser aumentada, caso a amostra não possa ser colhida de um local de predilecção e o tipo ou espécie de animal apresente maior risco de ser infectado (Regulamento (CE) 2075/2005).

O exame triquinoscópico não consegue detectar as espécies de triquinela não encapsuladas, que infectam os animais domésticos e selvagens e o ser humano, pelo que deixa de ser adequado enquanto método de detecção para ser utilizado como modelo. O método triquinoscópico só deverá ser utilizado em condições excepcionais nos matadouros, para exames de um pequeno número de animais abatidos por semana, desde que sejam tomadas medidas pelos operadores das empresas do sector alimentar para transformar a carne de forma a torná-la perfeitamente segura para consumo. No entanto, o método devia ser, mediante um período de transição, substituído por um método de detecção mais fiável (Regulamento (CE) 2075/2005).

Outros métodos, tais como testes serológicos, podem ser úteis para fins de vigilância, logo que tenham sido validados por um laboratório comunitário de referência, assim que este tenha sido nomeado pela Comissão. Os testes serológicos não são indicados para detectar individualmente em cada animal destinado ao consumo humano uma infecção por *Trichinella spp* (Regulamento da Comissão, 2005). No entanto, este tipo de testes são essenciais para fins de selecção em massa, com o objectivo de determinar a incidência de triquinelose em suínos

por regiões. O teste de ELISA é o de eleição (Martinez-Fernandez, 1999; Urquhart et al., 1996).

A congelação da carne sob condições específicas pode eliminar os parasitas presentes, mas algumas espécies de *Trichinella* que se encontram em caça e equídeos são resistentes quando a congelação é efectuada com recurso às combinações de tempo e temperatura recomendadas (Regulamento (CE) 2075/2005).

A vigilância regular de suínos domésticos, javalis selvagens, equídeos e raposas, ou outros animais indicadores, é um instrumento importante para avaliar as alterações em termos de prevalência da doença (Regulamento (CE) 2075/2005).

Aquando da fase aguda, ocorre hipereosinofilia, aumento das enzimas musculares e dos níveis séricos de IgE, logo o diagnóstico definitivo pode ser realizado através da biopsia de pelo menos em 1 g de tecido muscular (Martinez-Fernandez, 1999).

#### **e) Aspectos Zoonóticos**

Estudar os parasitas do género *Trichinella* oferece muitas vantagens aos cientistas de hoje. Este é um grupo de nemátodes zoonótico de vida silvestre que circula livremente entre hospedeiros, destacando-se a *Trichinella spiralis* que está excepcionalmente bem adaptada à espécie suína doméstica. Os relatórios recentes sugerem que as infecções humanas associadas ao contacto com animais de caça estão em ascensão no mundo inteiro, na Europa por *T. britovi* e ainda, existem numerosos países que enfrentam problemas com *T. spiralis* na área da restauração (Pozio, 2009).

A Triquinelose é uma zoonose parasitária de extrema importância a nível mundial e estima-se que poderá afectar cerca de 11 milhões de pessoas em todo o mundo, com especial incidência na França, Itália, China e México (Boireau et al., 1999 em Magalhães, 2003).

Infecções mais ligeiras (inferiores a 10 larvas por g de músculo) são assintomáticas, enquanto as infecções com um número de larvas superior a 50 por g de músculo pode pôr em perigo a vida humana (Magalhães, 2003).

É importante destacar que a triquinelose é basicamente uma infecção de animais silvestres e que o envolvimento do homem nestas circunstâncias é acidental.

A importância da fauna para fornecer hospedeiros para todas as espécies de *Trichinella* é sublinhada pela biomassa do parasita, que é maior em animais domésticos do que em animais silvestres; conseqüentemente, as únicas medidas que podem ser implementadas para reduzir a prevalência de infecção entre os animais silvestres é instruir caçadores para não deixar os cadáveres de animais no campo após a esfolagem ou removendo e descartando as vísceras, aumentando a probabilidade de transmissão a novos hospedeiros. Caso contrário, e como tem

acontecido nos últimos anos, a consequência da prática do caçador convencional em deixar as carcaças de animais no campo após a esfolagem e a prevalência de *Trichinella* entre a fauna silvestre tem sido documentada em regiões árticas e sub-ártico, no norte do Cazaquistão, na Extremadura (Espanha), e no noroeste da Rússia europeia. Enquanto não se conseguir implementar um manejo adequado dos animais domésticos e silvestres, a *Trichinella* (especialmente *T. spiralis*, mas também *T. britovi* e *T. pseudospiralis*) é transmitida a partir do ciclo silvático para o ciclo doméstico, por vezes através de animais sinantrópicos (intermediário entre espécies domésticas e silvestres). Além disso, esta situação pode tornar-se reversível, nos casos em que os animais domésticos infectem a vida silvestre através de animais domésticos, principalmente, os suínos em regime extensivo ou de pequenos produtores que morrem no campo e não são devidamente removidos.

Conclusivamente, há provas abundantes de que a triquinelose em seres humanos pode ser monitorizada e controlada em certas medidas com um sistema de informação e análise rigorosos, uma opção que requer uma boa interacção entre o sector da saúde pública e o sector veterinário correspondente. É de se esperar que, a maioria dos países afectados serão capazes de participar na campanha para minimizar a infecção de seres humanos por este parasita (Gottstein et al., 2009).

**Tabela 3:** Principais características zoonóticas das espécies e genótipos da *Trichinella* (Gottstein et al., 2009).

Espécies	Principal fonte de infecção humana	Resistência das larvas em músculos congelados
<b>QUÍSTICA</b>		
<i>T. spiralis</i>	Suínos domésticos e silvestres e cavalos	Cavalo
<i>T. nativa</i>	Ursos	Carnívoros
<b>Genótipo T6</b>	Carnívoros	Carnívoros
<i>T. britovi</i>	Javalis, suínos, cavalos, raposas	Cavalos e carnívoros
<b>Genótipo T8</b>	Não documentado	Negativo
<i>T. murrelli</i>	Ursos e cavalos	Negativo
<b>Genótipo T9</b>	Não documentado	Negativo
<i>T. nelsoni</i>	Facoqueiros, suínos	Negativo
<b>Genótipo T12</b>	Não documentado	Desconhecido
<b>NÃO QUÍSTICAS</b>		
<i>T. pseudospiralis</i>	Suínos domésticos e silvestres	Negativo
<i>T. papuae</i>	Suínos silvestres	Negativo
<i>T. zimbabwensis</i>	Não documentado	Negativo

### 3.4. Parasitas da Pele

#### 3.4.1. Sarna

A sarna é uma doença de pele contagiosa, caracterizada por originar dermatite pruriginosa, irritação e queda de pêlo, sendo responsável pela mesma por uma grande variedade de ácaros que penetram na pele ou vivem sobre esta.

Existem numerosas manifestações cutâneas que poderão ser confundidas com a sarna, mas têm sempre que ser consideradas como diagnósticos diferenciais, incluindo aqueles que resultam de reacções alérgicas a outros tipos de ácaros, mordeduras e picadas de insectos e outros artrópodes, doenças fúngicas ou reacções físicas e químicas pelo contacto com plantas (OIE Terrestrial Manual 2008).

Os ácaros pertencem ao grupo dos artrópodes da classe dos aracnídeos, extremamente diverso e ubiqüitário. A maioria das espécies de ácaros da sarna agrupa-se somente, em duas subordens: Astigmata e Prostigmata. Os géneros economicamente mais importantes são: *Cheyletiella*, *Chorioptes*, *Demodex*, *Cnemidocoptes*, *Notoedres*, *Otodectes*, *Psorobia*, *Psoroptes* e *Sarcoptes* (OIE Terrestrial Manual 2008).

Os ácaros da sarna são na maioria debilmente escleróticos, têm movimentos muito lentos, são muito pequenos (100-900 µm) e vivem permanentemente nos seus hospedeiros.

Os ácaros da sarna não têm capacidade para viverem muito tempo fora do hospedeiro. A transmissão é tipicamente através do contacto directo com um animal infectado ou através do contacto com o ambiente envolvente do animal infectado. As sarnas mais frequentes nos cães são as provocadas por *Demodex* e a *Sarcoptes* (OIE Terrestrial Manual, 2008).

Relativamente a muitos estudos efectuados e na consequência deste estudo e das suas limitações, só irá ser abordado o género *Sarcoptes* com a espécie o *Sarcoptes scabiei*.

##### 3.4.1.1 *Sarcoptes*

O *Sarcoptes scabiei* é um ácaro pertencente à ordem Acarina e à família *Sarcoptidae*. Uma espécie dividida num número de variedades morfológicamente idênticas, com um elevado grau de especificidade do hospedeiro (Balestrieri et al., 2006).

A sarna sarcóptica é provocada pelo *Sarcoptes scabiei*, sendo responsável pela epidemia em populações de canídeos silvestres na América do Norte, Europa e Austrália, nos gatos silvestres da Europa e da África, nos ungulados selvagens e javalis da Europa, nos coalas na Austrália, e nos grandes primatas e vários bovinos selvagens de África (Pence, 2002).

Esta sarna é contagiosa entre os animais e o homem, por contacto directo. Causa alopecia como o *Demodex sp*, mas a perda de pêlo é tipicamente localizada na cabeça e na parte anterior do corpo em redor das orelhas no início da infecção pelo respectivo ácaro.

Este ácaro causa um extremo prurido (sem erupção da pele), afectando qualquer carnívoro em qualquer idade e não existe relação com o facto de animal ser saudável ou não.

Quando afecta o homem, causa pequenos inchaços vermelhos na pele que provocarão uma comichão constante. Quando o homem é exposto pode demorar 6 semanas a manifestar os sintomas se a pessoa for infectada pela primeira vez, caso contrário estes surgirão mais cedo. Perante isto, é essencial lavar bem a pele que esteve em contacto com animais infectados com sarna sarcóptica (OIE Terrestrial Manual 2008).

A única espécie deste ácaro ocorre numa ampla variedade de mamíferos, mas por adaptação biológica desenvolveram-se genealogias, fortemente hospedeiro-específicas. Deste modo, o género *Sarcoptes* é bem conhecido em medicina humana e em veterinária como causa de sarna em humanos, cão, raposa, cavalos, bovinos entre outros (Urquhart et al., 1996). Perante o parâmetro de hospedeiro só faz sentido a pesquisa deste ácaro em carnívoros silvestres.

Os sarcoptes têm um contorno arredondado e até 0,4 mm de diâmetro, com patas curtas. Os seus aspectos identificadores mais importantes são as numerosas estrias transversais e escamas triangulares no dorso, características estas não apresentadas por nenhum outro ácaro da sarna de mamíferos domésticos (Urquhart et al., 1996).

#### **a) Ciclo biológico**

A fêmea fertilizada produz uma galeria ou túnel sinuoso nas camadas superiores da epiderme, nutrindo-se do líquido que flui dos tecidos lesados. Os ovos são postos nesses túneis, que podem, na verdade, alcançar o comprimento de diversos centímetros. Depois de depositar os ovos, a fêmea morre e os ovos eclodem em 3 - 5 dias e as larvas de seis patas arrastam-se pela superfície da pele. Essas larvas, por sua vez, escavam as camadas superficiais da pele e criam pequenas “bolsas de muda” nas quais se completam as mudas para a ninfa que têm 8 pernas, seguindo a transformação da ninfa em um adulto, ainda dentro da toca (túnel). O macho adulto emerge e procura uma fêmea na superfície cutânea ou numa bolsa de muda. Após a fertilização, as fêmeas produzem novos túneis, de novo ou por prolongamento da bolsa de muda. O ciclo evolutivo inteiro completa-se entre 17 a 21 dias (Urquhart et al., 1996).

Os ácaros preferem viver num animal, mas viverão por diversos dias no ambiente, fora do hospedeiro. Em ambientes húmidos e frescos podem viver até 22 dias com temperaturas normais, numa residência viverão por 2 a 6 dias. Devido à habilidade do ácaro em sobreviver fora do hospedeiro, os canídeos selvagens podem ficar infectados, mesmo sem terem tido contacto directo com um animal infectado, permitindo do mesmo modo a dispersão dos ácaros noutros habitats.

#### **b) Epidemiologia (prevalências)**

A sarna sarcóptica provoca uma infecção endémica e altamente prevalente em raposas na Europa e pode influenciar as populações e reduzir drasticamente a abundância da raposa vermelha por mais de 70% (Sréter et al., 2003).

Esta doença tem sido reportada em mais de 100 espécies de mamíferos silvestres e domésticos, que ocorrem por contacto directo ou indirecto; a transmissão tende a ser dependente da densidade de animais, e as espécies sociais são, geralmente as que se apresentam mais em risco de infecção (Balestrieri et al., 2006). Deste modo, a importância da densidade populacional da raposa para permitir que o parasita se estabeleça é clara, enquanto outros efeitos, como a dispersão, aumentam (Baker et al., 2000) e possivelmente a imunossupressão pode exacerbar a propagação do parasita durante um surto de sarna, mesmo que a densidade populacional global diminua. Talvez valha a pena notar que vários países europeus já experimentaram surtos de sarna sarcóptica em raposas nos últimos anos (Simpson, 2003 em Morgan, 2008), incluindo a Espanha e a Dinamarca (Morgan, 2008).

Esta sarna não parece ter efeitos a longo prazo sobre as populações de raposa, no entanto, já causou uma mortalidade devastadora de até 90% na Suécia, onde o parasita, estava previamente ausente das populações de raposa (Balestrieri et al., 2006).

No entanto, a sarna pode ter consequências graves em populações remanescentes ou isoladas, ameaçadas ou em perigo, onde a perda de até mesmo uns poucos indivíduos pode ser crucial para a sobrevivência ou a restauração de uma espécie (CITES: Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Silvestres) (Pence, 2002).

A taxa de prevalência pode ser subestimada devido à presença de doenças crónicas provocadas por formas subclínicas, que não são facilmente detectáveis mesmo por meio de raspagem de pele (Balestrieri et al., 2006).

#### **c) Patogenia/Sintomas**

Os sinais clínicos mais evidentes da sarna são: a perda de pêlo, pele com aspecto escamoso e irritada. No entanto, é importante ter em conta outros diagnósticos diferenciais, já referidos e que poderão ser confundidos com a sarna (OIE Terrestrial Manual 2008).

A raposa é afectada de forma letal por este tipo de sarna sarcóptica, a qual provoca um aumento de espessura muito acentuado da epiderme, contendo extensas galerias com elevado número destes ácaros (Bowman et al., 2009). Estes carnívoros podem sobreviver até mais de 9 meses após a infecção, contudo, durante este tempo têm de enfrentar uma série de outras ameaças parasitárias concomitantes, que podem contribuir para a sua mortalidade (Balestrieri et al., 2006).

Como consequência plausível da doença grave, os animais deixam de se alimentar e, conseqüentemente irão apresentar menores quantidades de reservas de gordura do que os animais não infectados bem como sinais clínicos de catabolismo muscular acelerado (Balestrieri et al., 2006).

Muitos estudos têm-se focalizado sobre os aspectos clínicos da sarna sarcóptica Morner e Christensson (1984), Bornstein et al. (1995), Little et al. (1998) e Martin et al. (1998), mas pouco se sabe sobre como a resposta do hospedeiro é afectada pela presença simultânea de outros parasitas.

#### **d) Diagnóstico**

O diagnóstico da sarna em animais domésticos é baseado nas manifestações clínicas e na observação dos ácaros ou dos seus estadios de desenvolvimentos através da realização de raspagens. Para a identificação destes, é necessário consultar chaves de diagnóstico especializadas e ilustradas com descrição taxonómica e referências. Para um bom diagnóstico é necessário aplicar técnicas especiais de recolha e observação no microscópio (OIE Terrestrial Manual, 2008).

No entanto, estas técnicas têm alguns limites de identificação, sendo necessário recorrer a testes de diagnóstico serológicos, que têm sido desenvolvidos para confirmação da identificação dos ácaros da sarna (OIE Terrestrial Manual, 2008).

Na maioria dos casos, é necessário fazer a raspagem sobre a lesão. A raspagem pode ser feita com uma lâmina de bisturi e raspar sobre a lesão até fazer sangue e depois depositar o raspado sobre uma lâmina de vidro com óleo, lactofenol ou glicerina, para ajudar a fixar os raspados na lâmina e como esclarecedor (OIE Terrestrial Manual, 2008).

Finalmente também poderá recorrer-se ao método de digestão artificial com hidróxido de potássio ou sódio a 10%, digerindo a pele para a libertação dos ácaros.

#### **e) Aspectos Zoonóticos**

Apesar de terem a sua própria “linhagem” de *Sarcoptes*, os humanos são infectados com muita facilidade por animais domésticos. A maior parte dos casos de origem animal é proveniente de cães, mas também ocorrem surtos em criadores e pastores intimamente envolvidos com as espécies bovina, ovina ou suína (Bowman et al., 2009; Urquhart et al., 1996).

As áreas mais facilmente afectadas são as que entram em contacto directo com os animais, nomeadamente as mãos, braços e peito. Deste modo 50% dos cães com sarna infectam os humanos, uma vez que os ácaros não têm dificuldade para penetrar na roupa.

Conseqüentemente os ácaros permanecem na pele do homem durante 2 a 4 semanas aproximadamente, provocando pequenas lesões papulares e pruriginosas. A sarna dura pouco tempo e frequentemente cura-se sem tratamento (Rochette, 2003).

Nos casos de infecção repetida por exposição com animais infectados, dentro de algumas horas de contacto com o animal pode aparecer um estado de hipersensibilidade, caracterizado por um vergão transitório (Urquhart et al., 1996).

A aparência das raposas sinantrópicas no ambiente e, com menos expressão, de outros canídeos silvestres com alta prevalência de sarna, pulgas e infecção por carraças pode resultar no aumento da incidência por parte destes parasitas nos animais domésticos e no homem (Sréter et al., 2003).

Aproximadamente 60% das pessoas em contacto íntimo com os animais infectados, poderão desenvolver pequenas lesões essencialmente ao nível dos antebraços e tronco, que provocam intensa comichão. As infecções humanas de origem animal diferem da típica sarna humana, no que diz respeito à duração da infecção, distribuição das lesões e outros sintomas. As infecções são geralmente de curta duração e auto-limitantes. As lesões geralmente começam nas partes do corpo mais expostas ao ar livre. Estas lesões regridem espontaneamente, uma vez, mas é incapaz de reproduzir com sucesso e persistir (Burgess, 1994). Posteriormente desenvolve-se uma pequena pústula ou pápula eritematosa e prurido intenso. Os ácaros que infectam os animais não abrem galerias muito profundas como os da sarna humana e a infecção geralmente diminui após algumas semanas, cerca de 4 semanas depois dos animais terem sido devidamente tratados.

Por outro lado, não há nenhum problema de saúde pública associado com sarna sarcóptica em mamíferos silvestres.

A estirpe humana deste ácaro (*Sarcoptes scabiei* var. *humanis*) tem o potencial de infectar os animais também. Num estudo de gorilas de montanha encontram-se evidências de uma grave infecção de escabiose em macacos já muito habituados aos seres humanos (Rabinowitz1 e Gordon, 2004).

## Capítulo 4 – Materiais e métodos

### 4.1. Caracterização das espécies animais (hospedeiros) em estudo

#### **LOBO IBÉRICO (*Canis lupus signatus*)**

##### **Estatuto e características da espécie**

No início do século XX, o lobo (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) ocupava quase toda a Península Ibérica. No entanto, à semelhança do que aconteceu no resto da Europa, uma drástica redução da sua área de distribuição e efectivo populacional verificou-se ao longo daquele século como resultado da forte perseguição por parte do homem, da redução das populações de ungulados selvagens e da destruição e fragmentação do habitat (Petrucci-Fonseca, 1990; Okarma, 1995).

Ainda que extinto em grande parte dos países europeus, tem-se assistido ao longo dos últimos 20 anos à recuperação desta espécie em parte da sua distribuição europeia, nomeadamente à re-colonização de países de onde tinha desaparecido, como França, Alemanha, Suíça, Suécia e Noruega (Boitani, 2000).

Em Portugal, o lobo ocorre numa área com uma extensão aproximada de 20000km<sup>2</sup>, localizada sobretudo a norte do rio Douro (ICN, 1997), o que representa cerca de 20% da área original, que correspondia à quase totalidade do território nacional ainda no início do século XX (Petrucci-Fonseca, 1990).

A população portuguesa compreende duas subpopulações: uma a norte do rio Douro, que se encontra em continuidade com a população ibérica e outra a sul do mesmo rio, aparentemente isolada da restante população ibérica e que apresenta um elevado nível de fragmentação (SNPRCN, 2006).

De acordo com os resultados do Censo Nacional de Lobo 2002/2003, o número de alcateias deverá variar entre 45 e 55 a norte do rio Douro, não ultrapassando as 10 a sul do mesmo. Com base na biologia da espécie estima-se que o efectivo populacional em Portugal varie entre 200 e os 400 indivíduos. A população portuguesa de lobos representa apenas cerca de 15% da Ibérica e não existem evidências de expansão recente da mesma (SNPRCN, 2006).

À excepção das florestas tropicais e dos desertos áridos, todos os habitats existentes no Hemisfério Norte já foram ocupados por este carnívoros. A ocupação do espaço depende fundamentalmente da disponibilidade e acessibilidade de presas adequadas, tais como ungulados selvagens ou domésticos, e do grau de perturbação humana, mas normalmente o lobo adapta-se a todos os habitats terrestres. Geralmente, habita em campos abertos com

cobertura vegetal, mas também bosques abertos, tundra, florestas densas e montanha (SNPRCN, 2006).

A distribuição em Portugal reflecte em grande medida as áreas mais montanhosas, por apresentarem menores densidades populacionais humanas e uma utilização agrícola menos intensiva. Ocorre em florestas e matos temperados, pastagens naturais e artificiais, terrenos agrícolas e plantações (SNPRCN, 2006).

As alcateias podem percorrer 100 a 1000 km<sup>2</sup>. Os lobos vivem em grupos familiares chamados de alcateias. Sua liderança é feita por um macho e uma fêmea alfa, que são os reprodutores. O casal alfa inibe hormonalmente os outros lobos para que eles não acasalem. Os outros membros são em geral ninhadas mais velhas, mas podem ser também lobos não relacionados à família (SNPRCN, 2006).

A época de recria corresponde, normalmente ao período compreendido entre os meses de Agosto a Outubro. Ou seja, é uma época de dependência das crias, em que estas já poderão responder ao estímulo e ainda permanecem no local de criação. Este facto é bom para as estações de escuta e também de espera, para estudos de telemetria, e que ajuda na localização e identificação dos locais de recria (Censo Nacional, 2005).

Relativamente à dieta o lobo é um animal oportunista, alimenta-se de ungulados, lagomorfos, roedores, aves e carcaças. O lixo produzido pelo homem pode ser uma fonte de alimento importante.

Num estudo sobre os hábitos alimentares de um grupo reprodutor de lobos no noroeste de Portugal, destaca-se a elevada importância dos ungulados domésticos com uma frequência de aparição de 76,8%. Os ungulados selvagens (corço e javali) representam apenas 8,6% das aparições registadas (Roque et al, 2001)

A sul do rio Douro existem também em algumas zonas núcleos populacionais de cervídeos e de javali, como principais presas do lobo, nomeadamente nas regiões fronteiriças (Roque et al, 2001).

Por conseqüente relação ecológica e partilha do mesmo habitat, assim as raposas e os cães, partilham o mesmo ciclo de alimentação.

### **Factores de ameaça**

Ao longo dos séculos, o lobo foi um dos animais mais temidos e odiados pelo homem e a caça e destruição do seu habitat levaram à sua extinção em várias regiões em que antes era comum. Assim como o aumento da prevalência de doenças infecciosas e parasitárias têm cada vez mais importância na sua sobrevivência, assumindo o lobo cada vez mais o papel de reservatório de alguns agentes para os humanos.

## **RAPOSA-VERMELHA (*Vulpes vulpes silacea*)**

### **Estatuto e características da espécie**

A raposa-vermelha (*Vulpes vulpes silacea* Miller, 1907) é um mamífero carnívoro, de médio porte, com os pêlos geralmente castanho-avermelhados, (nas crias essa pelagem é castanho-escura, e só depois dos primeiros 6 meses de vida a sua coloração se torna igual à dos adultos). É também um dos carnívoros com mais distribuição pelo mundo e que apresenta grande capacidade de adaptação. Tem hábitos noturnos e crepusculares (excepto em lugares de pouca movimentação podendo ser vista durante o dia). A dieta é variável, é oportunista e come em média cerca de 500g de alimento todos os dias, caça geralmente animais pequenos como coelhos e lebres, roedores, aves, insectos, peixes, ovos e frutos, Rejeita normalmente musaranhos e toupeiras, mas come ouriço-cacheiro. Pratica necrofagia em zonas rurais e urbanas. Apresenta cerca de 20 esconderijos para comida lembrando-se de todos eles e em caso de necessidade esse animal pode alimentar-se de restos de comida humana e animais mortos, tudo isso devido à sua grande capacidade de adaptação (Macdonald, 2001).

As raposas-vermelhas acasalam entre Dezembro e Fevereiro. A sua gestação dura cerca de 60-63 dias, consistindo em ninhadas de 4-8 crias (máximo 12 crias) uma vez por ano. Ambos os progenitores (pai e mãe) cuidam de seus filhotes e mesmo depois do desmame eles só se tornam independentes no Outono após seu nascimento. As raposas-vermelhas vivem em média 6 anos no ambiente silvestres e 13 em cativeiro (Macdonald, 2001).

As raposas têm sido caracterizadas como carnívoros solitários. Andam quase sempre sózinhas, ao ponto de que a caça em grupo acaba por ser um entrave em vez de uma vantagem para estes animais. No entanto novos estudos têm revelado dados muito interessantes relativamente a este comportamento individualista destes animais. Em algumas áreas as raposas são monogâmicas, noutros elas vivem em grupos, geralmente formados, na grande sua maioria, por um macho adulto e várias fêmeas que vivem em tocas protegidas pela vegetação, sendo estas construídas por elas mesmas ou aproveitadas de antigas tocas de coelhos e texugos. Contudo, o tamanho máximo do grupo corresponde a 6 elementos para este tipo de raposa (Macdonald, 2001).

As fêmeas raramente fazem migrações entre grupos, e quando o fazem não são bem sucedidas, contrastando com os machos que na maioria emigram com elevada frequência (Macdonald, 2001). Os juvenis (6-12 meses de idade) podem andar grandes distâncias (exemplo 250 km), mas deslocam-se geralmente 5 a 10 vezes o diâmetro do domínio vital dos progenitores, dispersando-se os machos para mais longe.

Nestes animais tanto o território como o tamanho do grupo são factores independentes. Eles marcam o território com fezes e urina. Normalmente, marcam mais os sítios que mais vezes frequentam. Os animais dominantes são os que marcam mais o território. O tamanho dos territórios varia consoante a disponibilidade de alimento, a taxa de mortalidade associada a factores ambientais, a predação e essencialmente a interacção humana e a prevalência de raiva (Macdonald, 2001).

Estes animais habitam a América do Norte, a Eurásia e em esparsas populações o norte da África. Também há esparsas populações na Austrália, onde foram introduzidas para dar um fim em um outro animal que também foi introduzido, o coelho. Não são animais territoriais, mas vivem em lugares de comida em abundância. Estas raposas encontram-se em partes de clima temperado, não habitando assim zonas de climas equatoriais, tropicais e polares (Macdonald, 2001). A adaptação aos habitats europeus é quase sem limites, ocupando especialmente matagais em mosaico, florestas e campos agrícolas. É também abundante em zonas pantanosas, montanhas (acima da linha das árvores), dunas de areia, subúrbios e cidades.

### **Factores de ameaça**

A raposa vermelha está pouco ameaçada sendo listada como “pouco preocupante” (LC) e por isso é caçada em muito lugares dos EUA e da Europa, durante os meses de Outubro a Fevereiro. Na Inglaterra foi proibida em 2005 a caça deste animal, que já era considerada uma tradição secular.

No entanto, a caça excessiva e a perda do seu habitat natural, podem colocar esta espécie em perigo.

Nas áreas onde a mortalidade é alta, esta pode atingir os 80% no primeiro ano de vida e poucas sobrevivem até aos 3 anos. Nas áreas onde a mortalidade é baixa, no primeiro ano podem morrer só 15% dos indivíduos e 60% das raposas podem atingir os 5 anos de idade.

### **CÃO DOMÉSTICO (*Canis lupus familiaris*)**

O **cão** (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758) é um mamífero que pertence à família *Canidae*, da qual fazem parte o lobo, o coiote e o chacal, e talvez o mais antigo animal domesticado pelo ser humano. É um animal social que na maioria das vezes aceita o seu dono como o “chefe da matilha” e possui várias características que o tornam de grande utilidade para o ser humano. Possui excelente olfacto e audição, é bom caçador e corredor vigoroso, é actualmente omnívoro, é inteligente, relativamente dócil e obediente ao ser humano, com boa capacidade de aprendizagem. Deste modo, o cão pode ser adestrado para executar grande

número de tarefas úteis ao homem, como cão de caça, cão pastor, como cão de guarda, sendo este tipo de cães que constituem a população desta espécie neste estudo.

Devido à grande variedade de raças existentes, as características dos cães são diversas.

Neste trabalho as amostras do cão doméstico correspondiam na grande maioria a cães de caça, pastores e errantes. A importância de incluir estes animais reside na comparação do seu grau de parasitismo, uma vez que estes acabam por frequentar os mesmos locais que o lobo e a raposa, comendo também cadáveres em campo, ficando assim expostos aos mesmos agentes parasitários que os canídeos silvestres.

#### **4.2. Metodologia de selecção e caracterização das áreas de estudo**

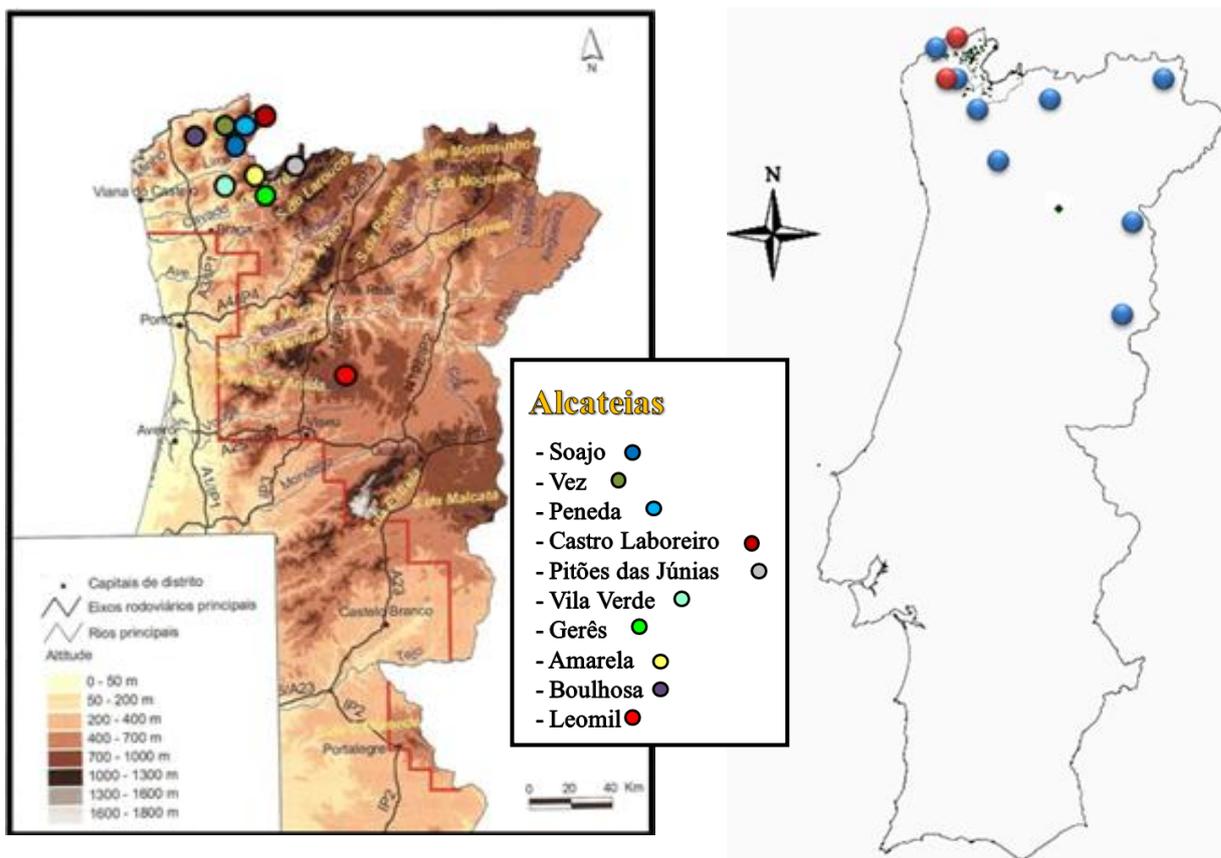
A área de estudo foi definida de acordo com a situação geográfica do PNPG e também com a incidência de um Projecto em lobo que está a ser desenvolvido, a Norte e a Sul do rio Douro, no qual tive a grata oportunidade de participar e simultaneamente integrar nos percursos para a colheita de amostras fecais. Deste modo, a área de estudo foi definida segundo transectos orientados em Projectos de monitorização e distribuição do lobo. Consequentemente, com estes projectos foram estabelecidos critérios para a confirmação da presença de alcateias, e é segundo estes dados, que delimitam as alcateias, que é representada a área de estudo deste trabalho.

A área compreende então, 9 alcateias (Soajo, Vez, Peneda, Castro Laboreiro, Pitões, Vila verde, Amarela, Gerês e Boulhosa) situadas a norte do rio Douro no núcleo populacional da Peneda/Gerês e 1 alcateia (Leomil) localizada na subpopulação de sul do rio Douro.

Os principais acidentes orográficos incluídos na área de estudo foram, a Norte do rio Douro, a Serra da Peneda, do Gerês, do Larouco, e a Sul deste rio, as serras de Montemuro, da Freita e Arada (Figura 1).

Relativamente aos rios que percorrem a área de estudo, destacam-se o Minho, o Lima, o Cávado (Norte), o Douro e o Paiva (Sul) (Figura 1).

A área de estudo abrangida por este trabalho, engloba regiões de características diferentes, podendo no entanto, caracterizar-se genericamente como uma área sobretudo montanhosa ou planáltica dominada por uma paisagem rural onde as áreas agrícolas alternam com manchas florestais e incultas e onde a criação de gado em regime extensivo é predominante. Deste modo, é uma área de grande diversidade, quer no que respeita a fauna, quer no que respeita a flora (Censo Nacional, 2005).



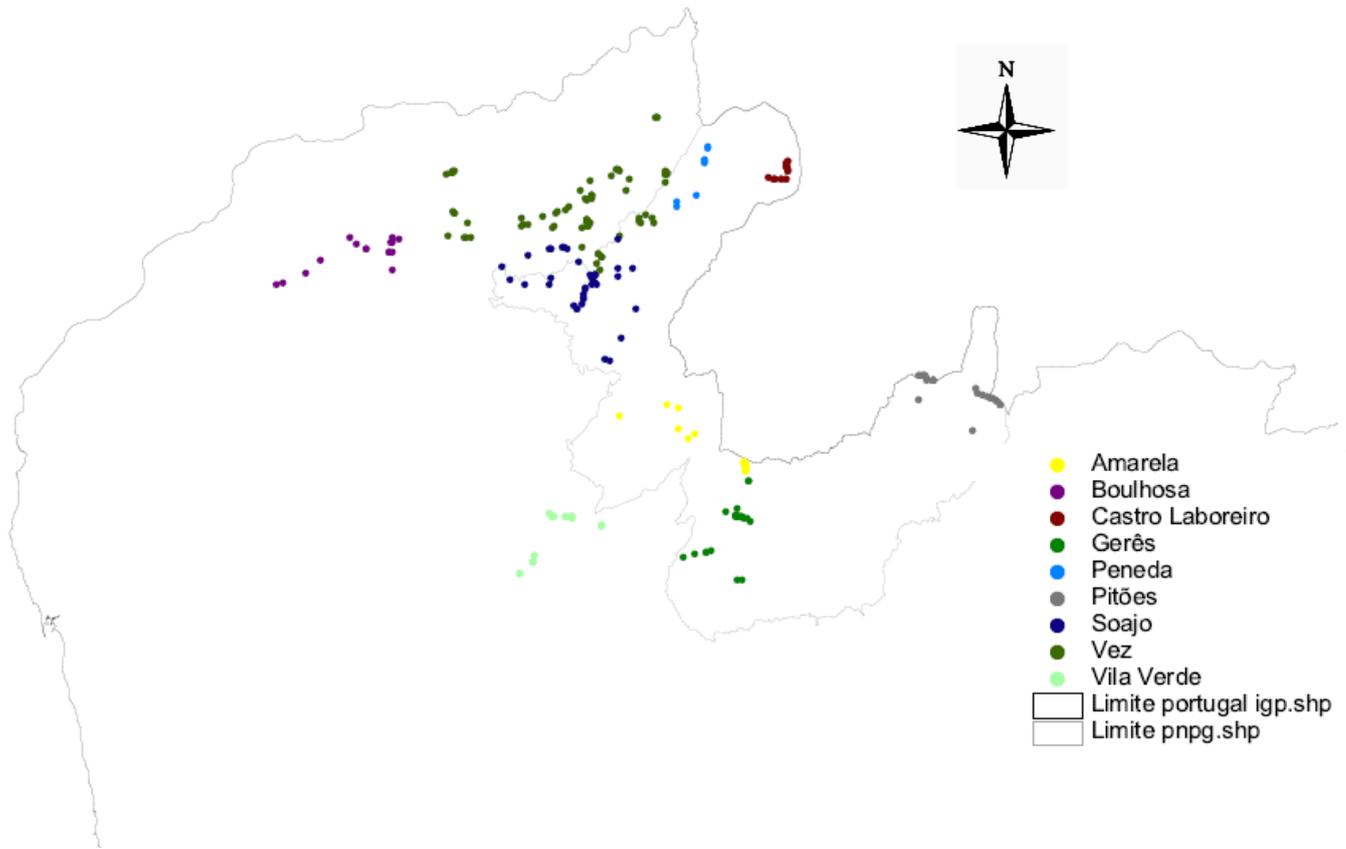
a)

b)

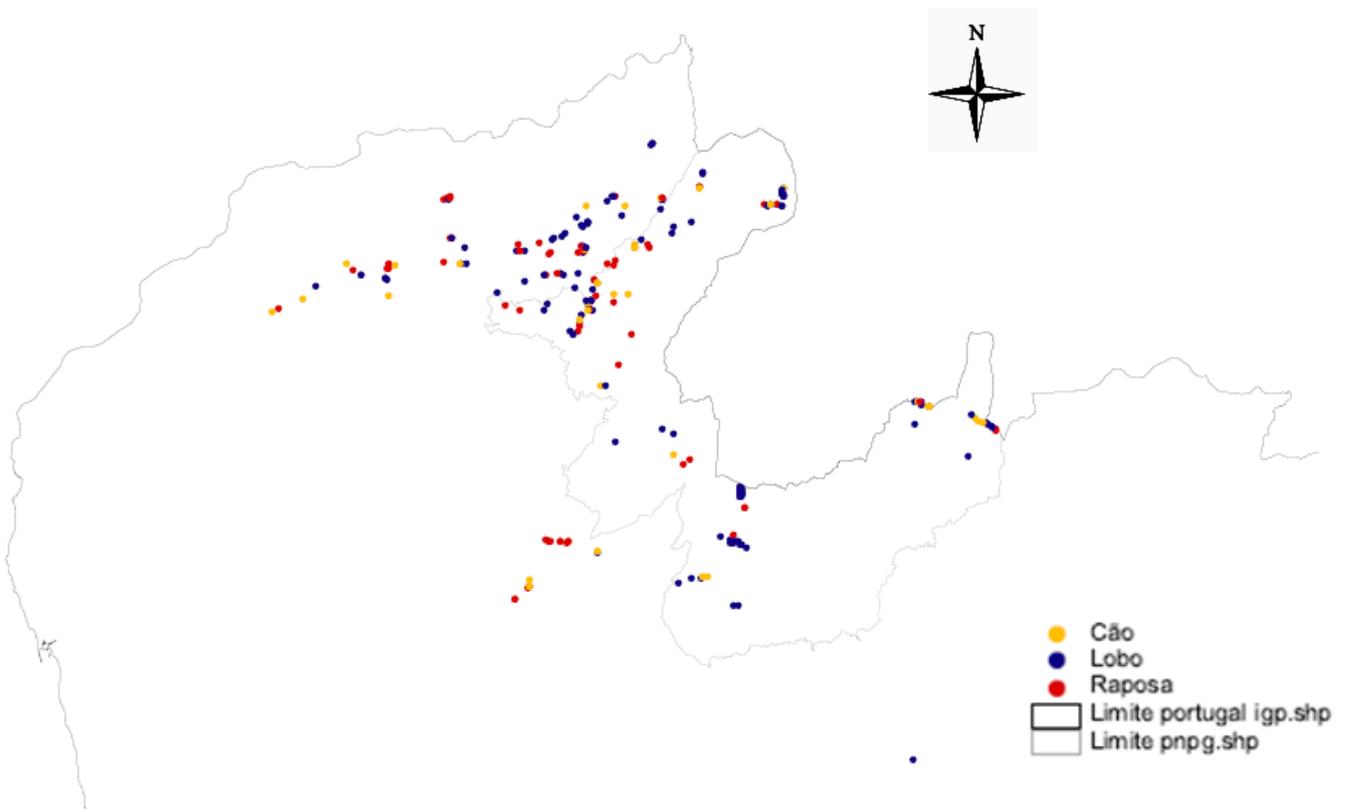
**Fig. 1:** a) Mapa que representa a área de estudo (adaptado do Censo Nacional, 2005); b) Mapa de Portugal com os pontos de GPS (pontos verdes) que identificam a área de estudo das amostras fecais e os restantes pontos identificam as localidades onde foram encontrados os cadáveres e nos quais foram colhidas amostras de músculo (pontos azuis) e pele (pontos vermelhos).

No trabalho de campo marcaram-se os pontos de GPS de recolha de amostras de fezes, através dos quais foi possível projectar os mapas que dão uma ideia da área geográfica que serviu de cenário para este estudo.

**Fig. 2:** Mapa com os pontos de GPS por aldeias, a norte do rio Douro pertencentes ao núcleo populacional da Peneda/Gerês



**Fig. 3:** Mapa com os pontos por espécie de canídeo em estudo



### 4.3. Técnicas de amostragem, colheita e preparação das amostras

#### - Método de campo

##### Colheita de amostras fecais

De toda a colheita de amostras considerada não invasiva, as de fezes são as mais frequentemente usadas em investigação de mamíferos silvestres.

O trabalho de campo constou em percursos realizados, aproximadamente de 15 em 15 dias para a recolha dos dejectos com a respectiva identificação, a qual foi registada em fichas de campo com as seguintes informações: nº de registo, data de recolha, local, coordenadas de GPS, espécie (*Canis familiaris*, *Canis lupus* e *Vulpes vulpes*), tipo de localização e origem, observações e alcateia (Anexo 1). Os percursos foram realizados de carro a uma velocidade que permitisse a detecção de indícios de presença dos respectivos animais em estudo, tendo sido os cruzamentos prospectados a pé dada a maior probabilidade de aí se encontrarem elevadas concentrações de dejectos, nomeadamente de lobo. Para atribuição, da espécie de origem, aos dejectos teve-se em conta o seu aspecto morfológico, conteúdo, odor, localização no terreno, prejuízos sobre os efectivos pecuários atribuídos ao lobo e indemnizadas pelo ICN, proximidade das populações, pastagens e zonas de caça e ainda, a repetição ao longo do ano da ocorrência e dejectos num determinado local de acordo com a espécie (Censo Nacional 2005).

Também é importante referir a presença, apesar de forma não sistemática, das informações recolhidas junto das populações, pastores e caçadores, como indicações para orientação da prospecção de campo.

**Figs 4, 5 e 6:** Colheita de amostras em campo



#### Colheita de amostras de músculo para pesquisa de *Trichinella sp*

Para a identificação de focos de Triquinelose silvática, as populações estudadas foram os mamíferos silvestres da ordem Carnívora, com especial relevância para as raposas (*Vulpes vulpes*) e lobos (*Canis lupus*).

O estudo foi realizado em colaboração com os responsáveis e colaboradores do Banco de Tecidos de Vertebrados Selvagens do PNPG (BTVS).

Para cada raposa e lobo foram seccionados músculos do antebraço dos dois membros torácicos e a língua inteira.

Estas amostras foram acondicionadas, individualmente, em sacos de plástico, identificado com um número de registo que está descrito numa base de dados que incluiu o respectivo número de identificação, espécie, origem (concelho) e estado de conservação. Estas amostras foram colhidas, identificadas e armazenadas a uma temperatura de -18° C antes de serem processadas.

#### Colheita de amostras de pele para pesquisa de ácaros da sarna

A colheita de amostras de pele foi efectuada aquando das necrópsias e nos casos macroscopicamente visíveis. A quantidade de amostras foi reduzida, mas representam casos de 2002-2008. Portanto, muito dos resultados foram cedidos pelo Dr. Nuno Santos, para assim poder completar o meu estudo nesta área.

### **4.4. Métodos/ Técnicas de laboratório**

#### - Técnicas coprológicas:

##### a) McMaster, flutuação e sedimentação

Recolhem-se as amostras de fezes, o mais frescas possíveis, apesar de nesta situação muitas das amostras não o serem, logo é necessário ter em conta este factor o que se esperará menos contagens do que corresponde na realidade. Depois de recolhidas as amostras rotularam-se os sacos com o número que corresponde a um conjunto de dados dispostos numa base de dados (Anexo 2).

Neste caso fizeram-se três tipos de exames num só procedimento, o **exame quantitativo – Mc-Master** (para contagem de ovo por grama de fezes) e **exame qualitativo - de Flutuação** (para pesquisa de ovos de nemátodes e oocistos de coccídeas) e de **Sedimentação** (para a pesquisa de ovos de Tremátodes e Céstodes, vistos serem ovos mais pesados do que os restantes) (Minderico, 1998; Procičchian, 2005).

Para as amostras de fezes é necessário um copo com 28 ml de solução saturada de açúcar, ao qual, com a ajuda de uma seringa, se juntam aproximadamente 2 gramas de fezes previamente homogeneizadas, para se obter um total de 30 ml (Minderico, 1998; Procičchian, 2005).

O primeiro exame que se faz é o **quantitativo – Técnica de McMaster**. Depois de diluir bem as fezes nos 28 ml de solução sacarose saturada, homogeneizar bem a suspensão e transferir para um recipiente similar passando-a através de peneira de chá ou em gaze dupla. Ainda sob homogeneização, verter o conteúdo do recipiente, com cuidado em cada um dos compartimentos da câmara de McMaster, deixar a câmara em descanso por 5 minutos. Finalmente observa-se ao microscópio na ampliação de 100x e efectua-se a contagem (Madeira de Carvalho, 2009; Thienpont et al., 1986).

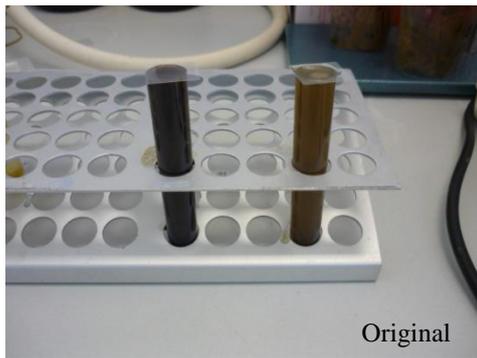
Primeiramente focar as linhas das retículas. Em seguida posicionar em um dos cantos de uma retícula e alterando ligeiramente o foco, focar os ovos/oocistos. Cada área definida por uma retícula deverá ser inteiramente coberta e os parasitas detectados contados progressivamente (Madeira de Carvalho, 2009; Thienpont et al., 1986).

Para o cálculo de o.p.g., multiplicar a soma dos ovos encontrados nos dois compartimentos por 50, uma vez, que cada compartimento embaixo da retícula comporta um volume de 0,15 ml (a área riscada é de 1 cm por 1 cm, e a altura é de 0,15 cm, perfazendo um total de 0,15 cm<sup>3</sup> ou 0,15 ml. Examinando-se os dois compartimentos, o volume total analisado será de 0,3 ml, que corresponde a 1/100 do volume total em que a amostra de fezes foi originalmente preparada (2 gramas em 30 ml). Para o cálculo de ovos por grama, a multiplicação deverá ser feita, portanto, por 50 (100 dividido por 2 gramas).



**Fig. 7:** Câmaras de McMaster

De seguida procede-se aos **exames qualitativos – Método de flutuação pela Técnica de Willis**, enchendo-se um tubo de ensaio, passando o conteúdo do copo através de um passador até formar um menisco convexo e no fim coloca-se uma lamela sobre ele; e o resto que fica no copo desperdiça-se. Após 10-15 minutos retira-se a lamela, colocando-a sobre uma lâmina para posterior observação ao microscópio na ampliação de 100x ou 400x, neste último caso para melhor observação das coccídeas.



**Fig.8:** Técnica de Willis

Em terceiro, e em último, fez-se o **Método de Sedimentação Natural**. Deixa-se sedimentar o conteúdo do tubo de ensaio e depois deita-se fora o sobrenadante, deixando o sedimento. Sobre o sedimento deitam-se uma ou duas gotas de azul-de-metileno e com ajuda de uma pipeta, espalha algum sedimento sobre uma lâmina e por fim observa-se ao microscópio na ampliação 100x.



**Fig.9:** Técnica de Sedimentação Natural (original)

b) Exame de fezes para pesquisa de *Cryptosporidium sp*

De maneira geral, várias técnicas têm sido utilizadas para facilitar o diagnóstico deste parasita com aparecimento dos oocistos nas fezes.

Neste caso, para evidenciar os oocistos de *Cryptosporidium*, foram efectuados esfregaços fecais directos e posteriormente corados pelo método de **Ziehl-Neelsen modificado**. É importante referir que este exame foi realizado com amostras, desde as mais frescas às mais secas.

### **Coloração Ziehl-Neelsen modificado.**

Em primeiro fixaram-se as lâminas em Metanol durante 1 min. De seguida mergulhou-se em Fucsina por 10 minutos e posterior lavagem com água.

A seguir procedeu-se à descoloração, mergulhando em HCl a 1% em Álcool até não sair mais corante e novamente a lavagem com água.

Depois mergulharam-se as lâminas em Verde Malaquite a 0,4% por 30 segundos com mais uma lavagem com água.

Deixou-se secar antes da observação das lâminas ao microscópio.

Os oocistos são observados em microscópio óptico e medidos com auxílio de uma ocular micrométrica. Os oocistos aparecem rosa escuro com granulações num fundo verde.



**Fig.10:** Lâminas de esfregaços fecais coradas pelo método de Ziehl-Neelsen modificado (Original)

Devido ao estado de conservação de algumas amostras, realizou-se a técnica de Imunofluorescência, para a confirmação de algumas amostras cuja observação do esfregaço da técnica anteriormente aplicada era inconclusiva. Deste modo, executou-se o teste Crypto/Giardia Cel IF.

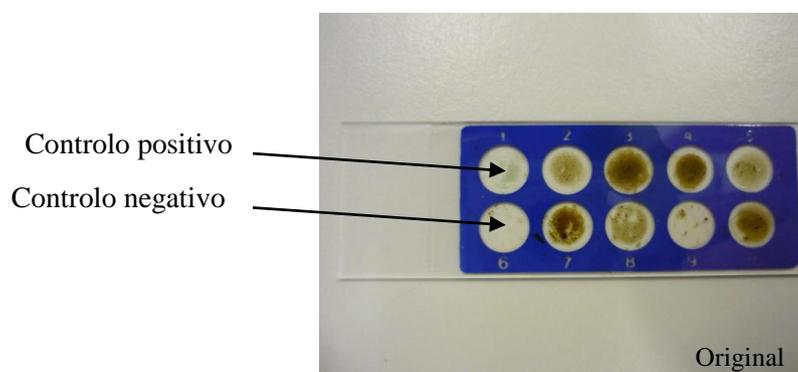
### **Teste Cripto/Giardia Cel IF**

O teste *Cripto/Giardia* Cel IF é um teste *in vitro* directo por Imunofluorescência para a detecção simultânea de cistos de *Giardia sp* e de oocistos de *Cryptosporidium sp* em amostras fecais e ambientais. O reagente de anticorpo monoclonal de rato marcado com fluoresceína liga-se, especificamente, aos oocistos de *Cryptosporidium* e/ou aos cistos de *Giardia* na amostra. Estes apresentam uma cor verde fluorescente com morfologia típica.

Podem ser utilizadas amostras fecais, frescas ou conservadas em 10 % de formalina ou em SAF (amostras tratadas com outros fixadores ainda não forem testadas). Se não forem analisadas imediatamente, as amostras podem ser conservadas a 2-8 °C durante 24-48 horas. Neste caso as amostras foram sempre conservadas a 4°C.

Depois foi efectuado o seguinte procedimento:

1. Preparação de uma diluição aproximada de 1/10 – 1/50 da amostra. Foram diluídos 50 µl ou 5 mm de diâmetro da amostra fecal em PBS com 0,1% de azida de sódio e misturados bem para que a amostra se disperse, utilizando um bastão de aplicação deixando que as partículas fecais sedimentem.
2. Depois colocaram-se 20 µL de amostra fecal ou amostra concentrada proveniente de água numa lâmina microscópica
3. Deixou-se a amostra secar ao ar completamente
4. Fixaram-se as lâminas durante 5 minutos em acetona e deixou-se secar ao ar
5. Adicionaram-se 25 µL de **Reagente Giardia/Crypto Cel (RR2)** à amostra já fixada e à lâmina de controlo positivo (CG), abrangendo bem toda a área
6. De seguida as lâminas foram incubadas a 37°C numa câmara húmida durante 30 minutos. Não deixar que as lâminas sequem; isto pode causar ligações não-específicas
7. Passou-se suavemente por uma lavagem de PBS por um minuto
8. Removeu-se eventual humidade à volta do poço com papel absorvente
9. Adicionou-se uma gota de meio de montagem (RMG) ao poço da lâmina. Colocou-se a lamela sobre a gota, retirando as bolhas de ar
10. Analisou-se toda a amostra com o auxílio de um microscópio de fluorescência, inicialmente com aumento de 200X, depois a 400X e a 1000X para efeitos de confirmação. Ler de imediato ou conservar a 2-8 °C no escuro num período máximo de 24 horas. Nos casos positivos os oocistos de *Cryptosporidium* sp. aparecem com uma coloração verde fluorescente.



**Fig.11:** Lâmina com as amostras, controlo positivo e negativo

#### - Técnica de diagnóstico da Sarna

Esta técnica foi adaptada do protocolo descrito no manual da OIE de 2008 para detecção de ácaros da sarna. Deste modo, esta mesma técnica consiste na digestão da pele para libertação dos ácaros em solução, é muito usada em casos em que simplesmente uma raspagem de pele não é suficiente para a detecção do agente causador da sarna. Perante isto, nos casos em que uma pele apresente ácaros mortos, grandes quantidades de flocos de pele ou escaras, ou grandes quantidades de cabelo deve proceder-se à aplicação desta técnica.

No laboratório procedeu-se ao isolamento do tecido cutâneo dos restantes tecidos. Depois de retiradas as amostras de pele do cadáver, estas foram seccionadas em 10 pedaços (1x1 cm), seguidamente colocados num copo com 18 ml de água e NaOH (a cobrir o fundo do copo) durante o tempo suficiente para digerir a maior parte do pêlo e da pele. Esta etapa deve ser realizada numa hote para limitar a exposição aos vapores cáusticos. Não deixar actuar a soda cáustica por um período prolongado de tempo, caso contrário os ácaros podem desintegrar-se. Após este processo a solução foi incubada na estufa a 36 °C durante cerca de 2 horas. De seguida, transferiu-se a solução para uns tubos, desprezando-se os pedaços de pele digeridos. Deste modo, o líquido da digestão foi então, dividido por 3 tubos de ensaio de 10 ml para irem à centrifugadora a 2.000 rpm/600 g (escala 4) durante 10 minutos.

Posteriormente, desprezou-se o sobrenadante, efectuando-se um esfregaço do depósito, deixado nos tubos, em lâmina de microscópio e aplicando lactofenol como esclarecedor. A observação foi feita na ampliação de 100 x (ocular 10x e objectiva de 10x).

#### - Técnica de digestão artificial para pesquisa de *Trichinella*

Para a pesquisa de larvas de *Trichinella* utilizou-se o método de digestão artificial do tipo convencional descrito pela *International Commission on Trichinelosis* (2005), modificado para amostras individuais.

Este método simula o processo de digestão gástrica do tecido muscular o qual será digerido por uma proteinase ácida, a pepsina. As larvas enquistadas são libertadas para o líquido de digestão no qual podem sobreviver mais de 24 horas.

A sensibilidade nos métodos para a identificação e visualização do primeiro estágio larvar no tecido muscular depende de dois factores: quantidade de tecido muscular processado e o músculo escolhido.

## Digestão Artificial

Para cada pedaço de 10 g de músculo preparado e triturado (língua e músculo braquial) foi adicionado  $1,6 \pm 0,5$  ml de ácido clorídrico para dentro de um Erlenmeyer de 500 ml, contendo 200 ml de água da torneira, pré-aquecida a 46-48 °C; colocar uma vareta agitadora no copo, colocar o copo na placa pré-aquecida e iniciar o processo de agitação.

De seguida, submeteu-se a mistura ácida à acção da pepsina, adicionando-se  $1 \pm 0,2$  g de pepsina (1:10000 National Standard Formulary strength). Depois o músculo triturado foi transferido para o Erlenmeyer de 500 ml que contém a água, pepsina e ácido clorídrico. Durante este processo pode mergulhar-se várias vezes o dispositivo de triturar do misturador no fluido de digestão que se encontra no copo e enxaguar a taça do misturador com uma pequena quantidade do fluido de digestão para remover eventuais pedaços de carne que ainda aí se encontrem. Aquando da solução preparada cobriu-se o erlenmeyer com folha de alumínio.

Finalmente, foi introduzida a barra magnética no frasco, regulada para que possa manter durante todo o período de funcionamento uma temperatura constante de 44 a 46 °C. No decurso do processo de agitação, o fluido de digestão deve rodar a uma velocidade suficientemente elevada para formar um profundo turbilhão sem provocar salpicos. Tempo de agitação deve durar até que as partículas de músculo desapareçam – 60 min (aprox.).



**Fig.12:** Erlenmeyer de 500 ml com a solução: água, pepsina, ácido clorídrico e amostra de músculo triturado, sobre o agitador magnético.

### **Recuperação de larvas**

A amostra digerida foi filtrada para a um copo (ampola de decantação) passando-a pela peneira/crivo em inox com malha de 180  $\mu\text{m}$  e respectivo funil. Num processo satisfatório se ficar retido na peneira/crivo partículas de digestão do músculo que corresponda a 5% do peso da amostra inicial.

Depois deixou-se sedimentar a amostra durante 30 minutos na ampola de decantação.

Após este tempo o sedimento foi colhido, para uma proveta graduada, 40 ml do fluido digerido, num só movimento da torneira/válvula da ampola de decantação que regula o fluxo de saída. Finalmente deixou-se repousar 10 minutos.



**Fig.13:** Ampola de decantação

### **Observação e contagem de larvas**

Nesta fase foi retirado por aspiração 30 ml de sobrenadante.

A observação do sedimento ao estereomicroscópio foi feita com uma ampliação de 15 a 40x.

Se amostra não for límpida que permita uma boa observação do fundo da placa deve igualmente proceder-se à sua clarificação (deve permitir a leitura das letras de um jornal através da placa de Petri).

### **4.5. Análise estatística**

#### **- Quantificação de cada um dos géneros de parasitas por animal e por alcateia:**

Na análise para quantificar a presença de cada um dos géneros de parasitas encontrados, utilizou-se o programa Excel para a execução de tabelas de contingência com a prevalência (percentagem de amostras positivas no total de amostras analisadas) de cada resultado.

#### **- Distribuição dos parasitas por espécie animal (*C. lupus*, *V. vulpes* e *C. familiaris*) por alcateia**

Para comparar as frequências absolutas de cada género de parasita no lobo, efectuaram-se tabelas de contingências utilizando o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), no programa Excel. Para o mesmo estudo nas alcateias, apenas foram consideradas 7 alcateias das 9 examinadas, pois embora todas as amostras individuais fossem contabilizadas no total, em 2 alcateias a amostra era demasiado pequena para permitir uma análise diferencial.

O teste  $\chi^2$  é utilizado para o ajuste, quando se tem uma variável nominal com dois ou mais valores. As contagens dos números das frequências das observações em cada categoria são comparadas com as contagens esperadas, que são calculadas usando algum tipo de expectativa teórica.

Se o número esperado de observações em qualquer categoria é muito pequena, o teste do qui-quadrado pode fornecer resultados imprecisos.

#### **- Comparar o índice de intensidade de infecção de cada parasita**

Para este parâmetro recorreu-se ao número de ovos por grama de fezes (opg) e estatisticamente utilizaram-se os programas Excel e Graphpad InStat com a aplicação do teste de Kruskal-Wallis para comparar a distribuição dos diferentes parasitas por espécie de animal e por alcateia, uma análise de variância não paramétrica.

## Capítulo 5 – Resultados

### 5.1. Parasitas Gastrintestinais e Pulmonares

Na realização desta parte do trabalho de campo foram colhidas no total 314 amostras de fezes, das quais só foram analisadas 284, sendo as restantes rejeitadas por se encontrarem demasiado degradadas ou por falta de dados suficientes para a sua identificação específica.

As 284 amostras de fezes eram provenientes do território de 10 alcateias da região Norte de Portugal (Soajo, Vez, Amarela, Castro Laboreiro, Pitões das Júnias, Gerês, Peneda, Boulhosa, Vila Verde e Leomil) e também foram colhidas tendo em conta três espécies de canídeos: lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*) (n=164), raposa (*Vulpes vulpes silacea*) (n=81) e o cão (*Canis familiaris*) (n=39).

No total das amostras, 72,9 % (n=208) apresentavam formas parasitárias. Relativamente às prevalências de parasitismo simples e múltiplo, 33,2% (n=69) das amostras continham ovos ou oocistos de um parasita e 66,8% (n=139) mais do que uma espécie/género/família de parasita (infecção mista).

- **Distribuição dos parasitas pelas espécies de canídeos em estudo**

Em relação ao *C. lupus*, *V. vulpes* e *C. familiaris*, apresentaram resultados positivos em 68,3%, 84% e 69,2% das amostras, respectivamente. No seu conjunto, 72,9% das amostras fecais dos carnívoros estudados apresentavam pelo menos um elemento parasitário.

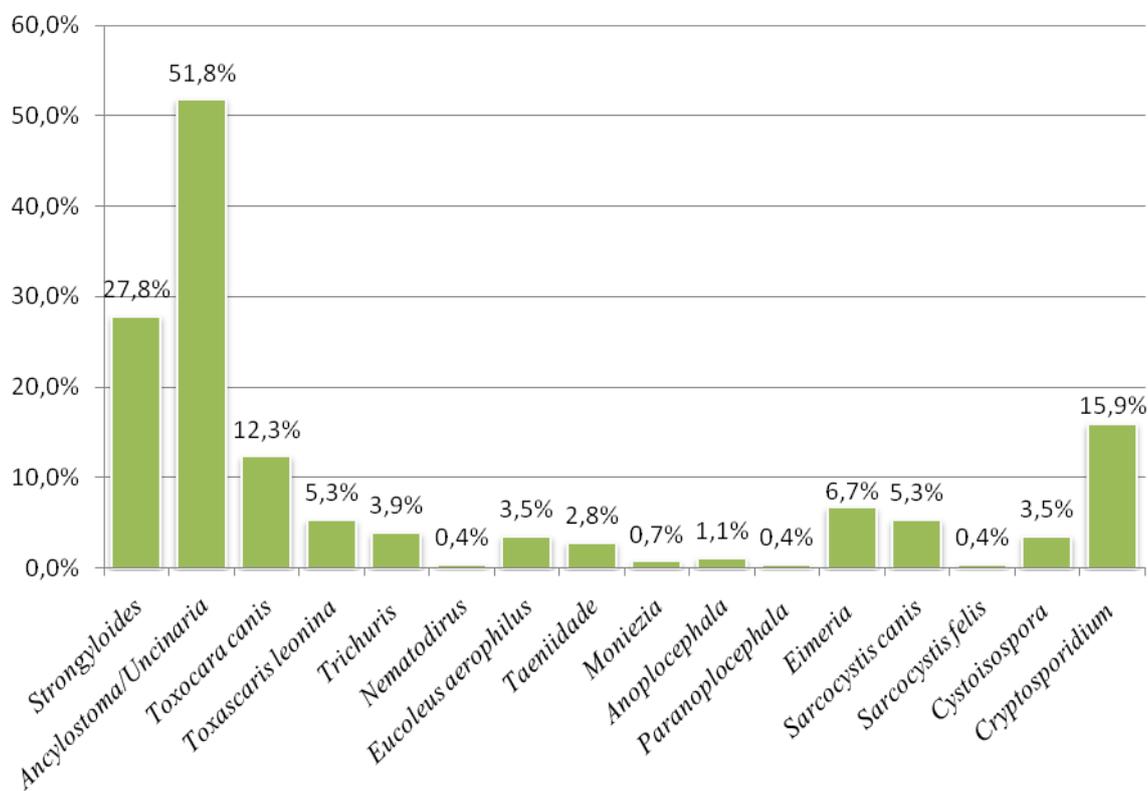
Entre os nemátodes, destacam-se os seguintes: dois membros da família *Ascarididae*, *Toxacara canis* (12,3%) e *Toxascaris leonina* (5,3%), dois da família *Trichuridae*, *Trichuris* (3,9%) e *Eucoleus aerophilus* (3,5%), a família *Ancylostomatidae*, onde não foi possível chegar ao género (51,8%). Nos protozoários destacam-se *Cryptosporidium* sp. (15,9%), o *Sarcocystis canis* (5,3%) e *Cystoisospora* sp.(3,5%).

Na tabela 4 e gráfico 5 estão representadas as prevalências da distribuição de cada espécie/género/família de parasita pelas três espécies de canídeos, no total das amostras e ainda a distribuição total dos mesmos através das respectivas prevalências.

**Tabela 4:** Prevalências de parasitas no lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*), raposa (*Vulpes vulpes silacea*) e cão (*Canis familiaris*), no total das amostras.

	<i>C. lupus</i> n=164	<i>V. vulpes</i> n= 81	<i>C. familiaris</i> n=39	Total n=284
<i>Strongyloides</i>	21,3%	42,0%	25,6%	27,8%
<i>Ancylostoma/Uncinaria</i>	45,7%	64,2%	53,8%	51,8%
<i>Toxocara canis</i>	7,3%	24,7%	10,3%	12,3%
<i>Toxascaris leonina</i>	7,3%	1,2%	5,1%	5,3%
<i>Trichuris</i>	3,7%	2,5%	7,7%	3,9%
<i>Nematodirus</i>	0,6%	0,0%	0,0%	0,4%
<i>Eucoleus aerophilus</i>	4,3%	3,7%	0,0%	3,5%
<i>Taeniidae</i>	4,3%	0,0%	2,6%	2,8%
<i>Moniezia</i>	0,6%	0,0%	0,0%	0,7%
<i>Anoplocephala</i>	0,0%	1,2%	0,0%	1,1%
<i>Paranoplocephala</i>	0,0%	1,2%	0,0%	0,4%
<i>Eimeria</i>	4,9%	11,1%	5,1%	6,7%
<i>Sarcocystis canis</i>	7,9%	1,2%	2,6%	5,3%
<i>Sarcocystis felis</i>	0,6%	0,0%	0,0%	0,4%
<i>Cystoisospora</i>	3,7%	1,2%	7,7%	3,5%
<i>Cryptosporidium</i>	13,5%	22,1%	13,5%	15,9%
<b>% amostras positivas no total das amostras para cada canídeo</b>	<b>68,3%</b>	<b>84,0%</b>	<b>69,2%</b>	<b>72,9%</b>

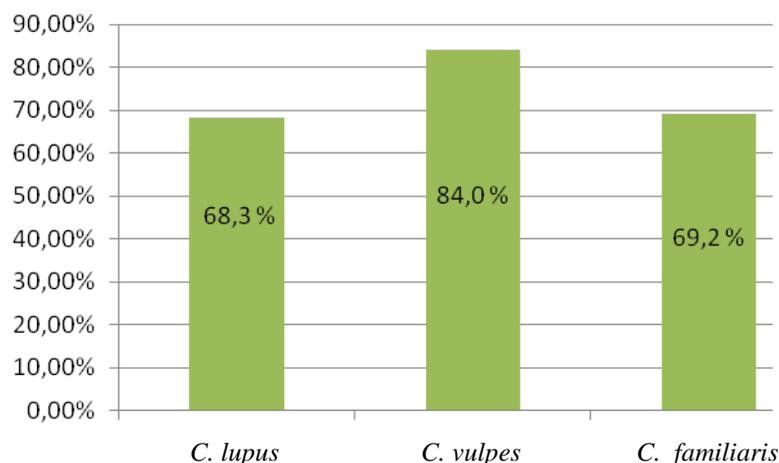
**Gráfico 5:** Gráfico das prevalências globais dos parasitas identificados nas amostras fecais das três espécies de canídeos



No gráfico 5 os *Ancylostomatidae* destacam-se como os parasitas com maior valor de prevalência, acima dos 50%, seguindo-se os géneros *Strongyloides*, *Cryptosporidium* e os nemátodos da espécie *Toxocara canis*. Também é importante referir o valor de percentagem da *Eimeria* (6,7%) bastante representativo nestes animais, uma vez que estes não são hospedeiros habituais e permanentes deste parasita, assim como, a existência dos géneros *Nematodirus* e *Moniezia* (normalmente associado a ruminantes), *Anoplocephala* e *Paranoplocephala* (dos equídeos) e o *Sarcocystis felis*.

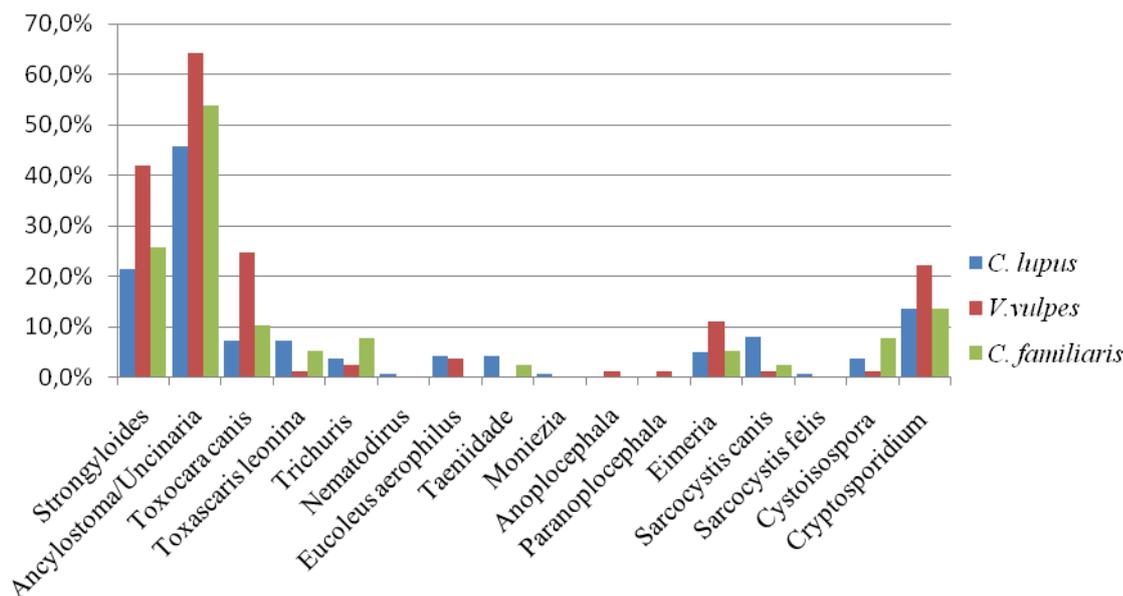
Relativamente à comparação das prevalências da distribuição dos parasitas pelas três espécies de canídeos merecem destaque o *Toxocara canis* onde se registaram diferenças significativas ( $\chi^2 = 16,05$ ; g.l.=2,  $p < 0,05$ ), os *Ancylostomatidae* onde também se registaram diferenças significativas ( $\chi^2 = 7,41$ ; g.l. = 2,  $p < 0,05$ ), assim como os nemátodos dos géneros *Strongyloides* ( $\chi^2 = 11,60$ ; g.l. = 2,  $p < 0,05$ ) e *Anoplocephala* ( $\chi^2 = 7,6$ ; g.l. = 2,  $p < 0,05$ ). Finalmente no parasitismo total, também foi significativa a diferença de distribuição das amostras parasitadas pelas três espécies de canídeos ( $\chi^2 = 7,03$ ; g.l. = 2,  $p < 0,05$ ).

**Gráfico 6:** Gráfico das prevalências do número de amostras positivas para cada uma das espécies de canídeos em estudo.



No gráfico 6 é possível observarem-se as prevalências, considerando apenas as amostras positivas para cada espécie de canídeo. As prevalências foram todas elas elevadas, sendo de destacar a raposa como o carnívoro com maior prevalência de amostras positivas, 84%, apresentando o lobo e o cão valores próximos de 70%, sendo ligeiramente superior para os carnívoros domésticos.

**Gráfico 7:** Distribuição das prevalências dos parasitas nas amostras fecais de cada espécie de canídeo



Como já foi possível constatar na tabela 4 e gráfico 5 os parasitas com maior prevalência foram os *Ancylostomatidae*, *Strongyloides*, *Toxocara canis* e o *Cryptosporidium*. Perante isto, ao comparar estes valores com os do gráfico 7, é possível observar que se destaca a raposa na ordem dos valores apresentados, assim como nos resultados da *Eimeria*. Nos restantes parasitas, esta situação já não se regista, como no caso do *Toxascaris leonina*, do *Eucoleus aerophilus*, dos parasitas da família *Taeniidae* e do *Sarcocystis canis*, representados maioritariamente nas amostras fecais de lobo.

Curiosamente nos resultados do cão doméstico evidenciaram-se relativamente aos géneros *Trichuris*, da *Eimeria* e do *Cystoisospora*.

- **Distribuição dos parasitas pelas alcateias de lobo-ibérico**

A tabela 5 mostra a distribuição dos diferentes parasitas no lobo-ibérico pelas 7 alcateias consideradas, perante critérios plausíveis, uma vez que eram as únicas que apresentavam dados significativos para a aplicação dos diferentes testes estatísticos.

No parasitismo total distingue-se a alcateia de Castro Laboreiro (80,0%), uma vez que apresenta o maior valor de prevalência, ao contrário da Serra Amarela (57,1%) que apresenta o menor valor. Contudo não existem grandes discrepâncias dos valores de distribuição pelas diferentes alcateias.

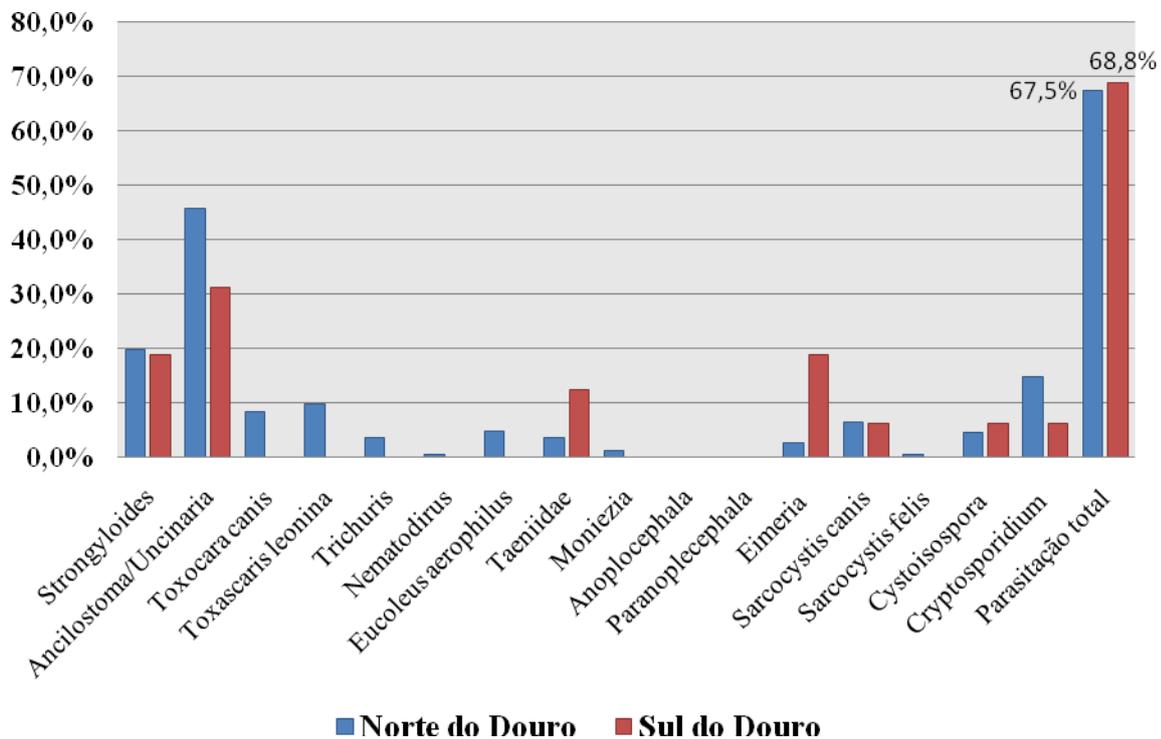
**Tabela 5:** Taxa de prevalência de helmintes e coccídeos no lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*) nas diferentes alcateias

	<b>Soajo n = 23</b>	<b>Vež n = 36</b>	<b>Amarela n = 28</b>	<b>C. Laboreiro n = 15</b>	<b>Pitões n = 14</b>	<b>Gerês n = 26</b>	<b>Leomil n = 16</b>
<i>Strongyloides</i>	17,4%	41,7%	3,6%	26,7%	14,3%	15,4%	18,8%
<i>Ancilostoma/Uncinaria</i>	39,1%	44,4%	46,4%	66,7%	28,6%	50,0%	31,3%
<i>Toxocara canis</i>	8,7%	13,9%	7,1%	13,3%	7,1%	0,0%	0,0%
<i>Toxascaris leonina</i>	13,0%	8,3%	3,6%	13,3%	21,4%	0,0%	0,0%
<i>Trichuris</i>	0,0 %	11,1%	3,6%	0,0%	7,1%	0,0%	0,0%
<i>Nematodirus</i>	0,0%	2,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>Eucoleus aerophilus</i>	4,4%	0,0%	14,3%	6,7%	0,0%	3,9%	0,0%
<i>Taeniidae</i>	4,4%	2,8%	3,6%	0,0%	7,1%	3,9%	12,5%
<i>Moniezia</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	7,1%	0,0%	0,0%
<i>Anoplocephala</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>Paranoplocephala</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>Eimeria</i>	0,0%	8,3%	3,6%	0,0%	0,0%	3,9%	18,8%
<i>Sarcocystis canis</i>	4,4%	5,6%	25,0%	0,0%	0,0%	3,9%	6,3%
<i>Sarcocystis felis</i>	0,0%	0,0%	3,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>Cystoisospora</i>	0,0%	2,8%	3,6%	0,0%	21,4%	0,0%	6,3%
<i>Cryptosporidium</i>	13,0%	20,6%	10,7%	20,0%	21,4%	3,9%	6,3%
<b>Parasitismo total</b>	<b>69,6%</b>	<b>72,2%</b>	<b>57,1%</b>	<b>80,0%</b>	<b>64,3%</b>	<b>61,5%</b>	<b>68,8%</b>

Neste caso foram encontradas diferenças significativas na taxa de prevalência entre alcateias para *Strongyloides* ( $\chi^2 = 15,9$ ; g.l. = 6,  $p < 0,05$ ), no *Sarcocystis canis* ( $\chi^2 = 15,6$ ; g.l. = 6,  $p < 0,05$ ) e no *Cystoisospora* ( $\chi^2 = 14,8$ ; g.l. = 6,  $p < 0,05$ ).

Pelos mapas apresentados anteriormente, consta-se que a maior parte das alcateias estudadas (Soajo, Vež, Amarela, Castro Laboreiro, Pitões, Gerês) localizam-se a norte do rio Douro, no entanto houve uma alcateia (Leomil) bem distinta, ao nível dos resultados, que se encontra a sul do rio Douro. Perante isto, é então possível comparar os resultados de distribuição da média das taxas de prevalência dos parasitas nas amostras de lobo (Gráfico 8).

**Gráfico 8:** Distribuição da média das taxas de prevalência dos parasitas de *C. lupus* a norte e a sul do rio Douro.



Pela observação do gráfico 8 pode observar-se que a sul do rio Douro foi encontrada uma menor diversidade de parasitas, destacando-se os das famílias *Taeniidae*, *Eimeria* e *Cystoisospora* em relação às percentagens obtidas para os parasitas a norte do rio Douro. No entanto, no parasitismo total a diferença entre as duas zonas geográficas aqui referidas é muito reduzida, representando cerca de 1,3%.

- **Intensidades médias e amplitudes de OPG**

Nas tabelas 6 até à 12 estão apresentadas as intensidades médias de infecção e amplitudes de alguns parasitas (expressas em opg), tendo só em conta as amostras em que foi possível obter contagens suficientes de ovos por grama de fezes. Para a determinação dos resultados utilizaram-se os valores referentes às espécies de canídeos em causa e das 10 alcateias. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar a distribuição dos diferentes parasitas pelas três espécies de canídeos e por alcateias.

**Tabela 6:** Intensidades médias de infecção dos diferentes parasitas e amplitude de excreção parasitária no lobo-ibérico, expressas em número de ovos por grama de fezes (opg).

Parasitas	Intensidade média (opg)	Amplitude (opg)
<i>Strongyloides</i>	350	50 - 1350
<i>Ancylostoma/Uncinaria</i>	976,3	50 - 5900
<i>T. canis</i>	3664,3	50 - 14900
<i>T.leonina</i>	987,5	100 - 3000

**Tabela 7:** Intensidades médias de infecção dos diferentes parasitas e amplitude de excreção parasitária na raposa, expressas em número de ovos por grama de fezes (opg).

Parasitas	Intensidade média (opg)	Amplitude (opg)
<i>Strongyloides</i>	950	50 - 11300
<i>Ancylostoma/Uncinaria</i>	638,8	50 - 6200
<i>T.canis</i>	2253,9	50 - 8000
<i>T.leonina</i>	-	-

**Tabela 8:** Intensidades médias de infestação dos diferentes parasitas e amplitude de excreção parasitária no cão, expressas em número de ovos por grama de fezes (opg).

Parasitas	Intensidade média (opg)	Amplitude (opg)
<i>Strongyloides</i>	291,7	50 - 750
<i>Ancylostoma/Uncinaria</i>	654,1	50 - 2450
<i>T. canis</i>	900	200-1600
<i>T. leonina</i>	200	150 – 250

Comparando as diferentes tabelas de intensidades médias e amplitude de opg (tabelas 6, 7 e 8), é possível observar-se que o lobo e a raposa apresentam valores de contagem mais elevados, relativamente ao cão doméstico. Nas três espécies de canídeos os ovos de *Toxocara canis* são os que apresentam a maior intensidade média. No lobo a amplitude é bem marcada em *T. canis*, por sua vez, na raposa esta situação regista-se nos *Strongyloides*.

Não se encontraram diferenças significativas entre espécies na comparação dos níveis de infecção por *Strongyloides*, *Ancylostoma/Uncinaria*, *T. canis* e *T. leonina*:

- *Strongyloides* (KW=0,071; p> 0,05)

- *Ancylostoma/Uncinaria* (KW=1,987; p> 0,05)
- *T.canis* (KW=0,673; p> 0,05)
- *T. leonina* (KW=1,640; p> 0,05)

**Tabela 9:** Intensidades médias de infecção por *Strongyloides* e amplitude de excreção parasitária por alcateia, expressa em número de ovos por grama de fezes (opg).

<i>Strongyloides</i>	Intensidade média (opg)	Amplitude (opg)
<b>Soajo</b>	200	100-300
<b>Vez</b>	225	50-750
<b>Amarela</b>	-	-
<b>Castro Laboreiro</b>	800	250-1350
<b>Pitões</b>	125	50-200
<b>Gerês</b>	650	-
<b>Leomil</b>	50	-

Na tabela 9 estão representadas as intensidades relativas aos ovos de *Strongyloides*. Na serra Amarela não foi possível fazer contagens essencialmente, porque este parasita não foi detectado pela técnica de McMaster na única amostra positiva para este parasita. Nas alcateias do Gerês e Leomil como só se efectuou uma contagem em cada uma delas, consequentemente não foi possível definir a amplitude dos níveis de opg. Nestes casos a intensidade média corresponde a um único valor de contagem realizado.

A alcateia de Castro Laboreiro apresenta o maior valor de intensidade média e amplitude de opg.

**Tabela 10:** Intensidades médias de infecção por *Ancylostoma/Uncinaria* e amplitude de excreção parasitária por alcateia, expressa em número de ovos por grama de fezes (opg).

<i>Ancylostoma/Uncinaria</i>	Intensidade média (opg)	Amplitude (opg)
<b>Soajo</b>	150	50-200
<b>Vež</b>	550	50-5900
<b>Amarela</b>	1075	50-5850
<b>Castro Laboreiro</b>	225	50-400
<b>Pitões</b>	100	-
<b>Gerês</b>	600	50-5050
<b>Leomil</b>	150	100-1700

Na tabela 10 estão representadas as intensidades de opg dos *Ancylostomatidae*. Destaca-se a serra Amarela com o maior número de contagens e com a maior intensidade média de excreção parasitária registada nas respectivas amostras. Por outro lado, na alcateia do Vež regista-se o maior valor de amplitude.

Não foi possível fazer mais do que uma contagem, nas amostras da alcateia de Pitões, logo esta não apresenta valores de amplitude, correspondendo-lhe o menor valor de intensidade média.

**Tabela 11:** Intensidades médias de infecção por *T. canis* e amplitude de excreção parasitária por alcateia, expressa em número de ovos por grama de fezes (opg).

<i>Toxocara canis</i>	Intensidade média (opg)	Amplitude (opg)
<b>Soajo</b>	550	-
<b>Vež</b>	12100	9300-14900
<b>Amarela</b>	125	50-200
<b>Castro Laboreiro</b>	250	-
<b>Pitões</b>	400	-
<b>Gerês</b>	-	-
<b>Leomil</b>	-	-

Na tabela 11 estão registados os resultados para os ovos de *Toxocara canis*. Nas alcateias do Gerês e Leomil não foi possível fazer contagens, essencialmente porque este parasita não apareceu aquando da realização da técnica de McMaster. Nas alcateias do Soajo, Castro

Laboreiro e Pitões só foi possível efectuar uma contagem, conseqüentemente não se definiu a amplitude dos níveis de opg.

A alcateia do Vez apresenta a maior intensidade média e amplitude de opg no total de todas as contagens aqui representadas.

**Tabela 12:** Intensidades médias de infecção por *T.leonina* e amplitude de excreção parasitária por alcateia, expressa em número de ovos por grama de fezes (opg).

<i>Toxascaris leonina</i>	Intensidade média (opg)	Amplitude (opg)
<b>Soajo</b>	100	100-200
<b>Vez</b>	100	-
<b>Amarela</b>	150	-
<b>Castro Laboreiro</b>	150	-
<b>Pitões</b>	2400	1850-3000
<b>Gerês</b>	-	-
<b>Leomil</b>	-	-

Por fim, na tabela 12 estão registados os resultados para o *Toxascaris leonina*. Nas alcateias do Gerês e Leomil não foi possível fazer contagens essencialmente, porque mais uma vez este parasita não apareceu aquando da realização da técnica de McMaster. As alcateias do Soajo e Pitões foram as únicas em que foi possível efectuar mais do que uma contagem e conseqüentemente definir as amplitudes dos níveis de opg nas respectivas alcateias.

A alcateia de Pitões apresenta a maior intensidade média e amplitude de opg neste parasita, assim como o número de contagens.

Após a aplicação dos diferentes testes para comparar a distribuição dos ovos dos parasitas *Strongyloides*, *Ancylostoma/Uncinaria*, *T.canis* e *T. leonina* nas amostras de lobo pelas 7 alcateias, verifica-se que não existem diferenças significativas:

- *Strongyloides* (KW=7,551; p> 0,05)
- *Ancylostoma/Uncinaria* (KW=8,632; p> 0,05)
- *T.canis* (KW=5,786; p> 0,05)
- *T. leonina* (KW=5,613; p> 0,05)

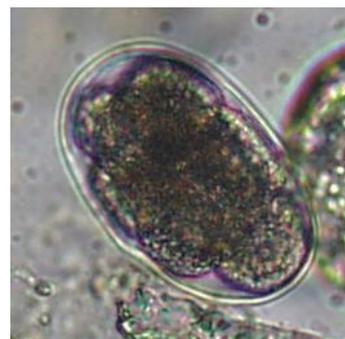
Para melhor representar os resultados obtidos no laboratório, de seguida irão ser apresentadas algumas fotografias dos diferentes ovos/oocistos dos parasitas nas diversas ampliações e técnicas laboratoriais aplicadas, tiradas ao microscópio por mim e pela Inês Bravo:



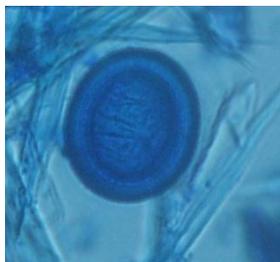
**Fig.14:** Ovo de *Toxocara canis* (ocular 10X e objectiva 10X) (Fonte: Original)



**Fig.15:** Ovo de *Strongyloides* (ocular 10X e objectiva 10X) (Fonte: Original)



**Fig.16:** Ovo de *Ancilostomídeo* (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original)



**Figs.17 e 18:** Oncosferas de parasitas da família *Taeniidae* (ocular 10x e objectiva 20x). a) Técnica de willis e b) Técnica de sedimentação natural (Fonte: Original)



**Fig.19:** Ovo de *Trichuris* spp (ocular 10x e objective 20x) (Fonte: Original)



**Fig. 20:** Ovo de *Capillaria* (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original)



**Fig.21:** Ovo de *Nematodirus* (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original)



**Fig.22:** Ovo de *T. leonina* (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original)



**Fig.23:** Ovo de *Paranoplocephala* (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original)



**Fig.24:** Ovos de *Moniezia* (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original)



**Fig.25:** Oocisto de *Cystoisospora* (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original)



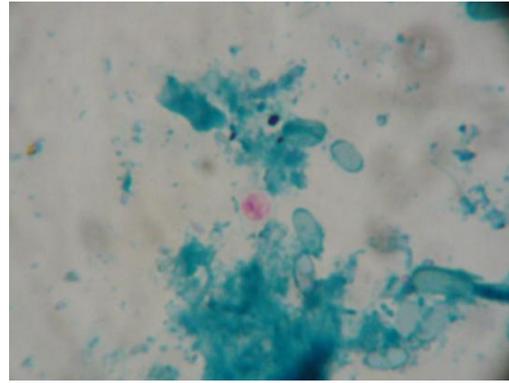
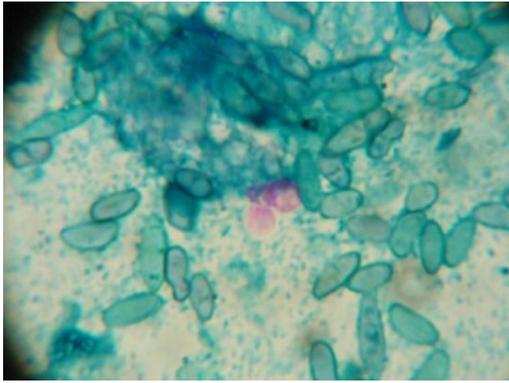
**Fig.26:** Esporocisto de *Sarcocystis* (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original)



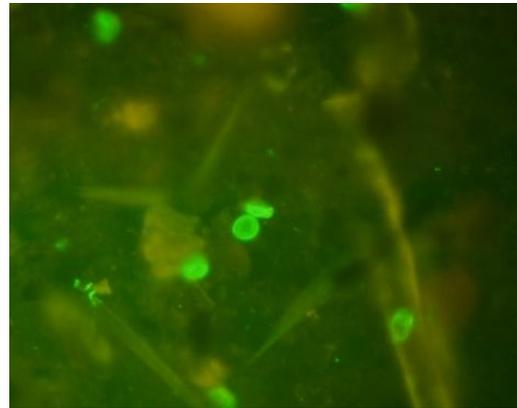
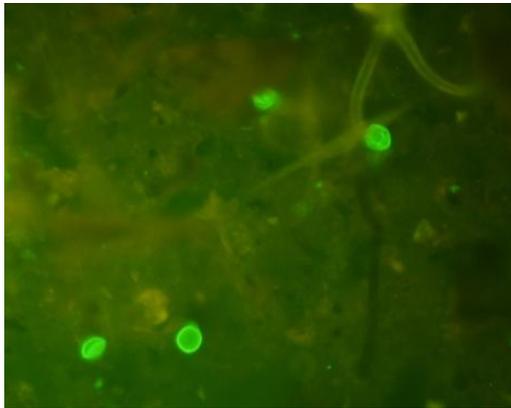
**Fig.27:** Oocisto de *Eimeria* (ocular 10x e objectiva 40x) (Fonte: Original)



**Fig.28:** Infecção mista – ovos de *Moniezia* e ancilostomídeos e oocistos de coccídeas (ocular 10x e objectiva 10x) (Fonte: Original)



**Figs. 29 e 30:** Oocistos de *C. parvum* corados por Ziehl-Neelsen (ocular 10 X e objectiva 100 X (imersão)) (Fonte: Original)



**Fig. 31 e 32:** Aspecto dos oocistos visualizados em imunofluorescência directa, após coloração com anticorpos monoclonais marcados (ocular 10 X e objectiva 40 X) (Fonte: Original)

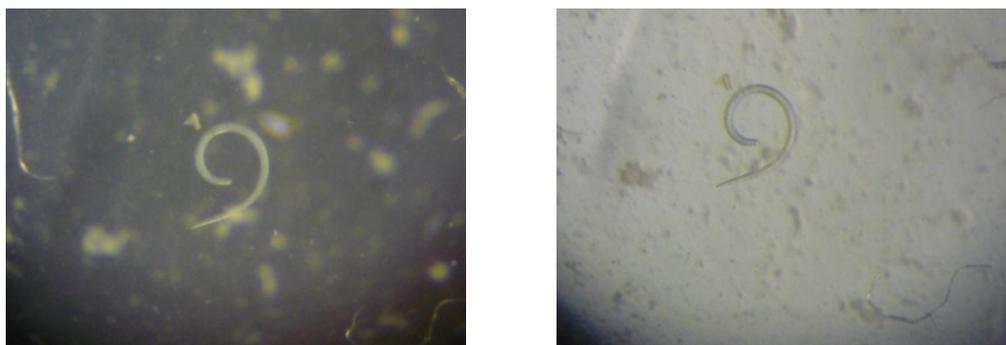
## 5.2. Parasitas Musculares

No que diz respeito aos tecidos musculares foram analisadas no total 22 amostras, em que 10 eram de lobo e 12 de raposa. Do total das amostras examinadas só se conhece a origem de 17, colhidas de animais provenientes de Viana do Castelo (3 conelhos), Braga (2 conelhos), Viseu (1 conelho), Vila Real (1 conelho), Bragança e Guarda (2 conelhos). Neste exame parasitológico foram isoladas L<sub>1</sub> de *Trichinella* sp. e os resultados para estes nemátodes estão descritos por hospedeiro e por localização da amostra na tabela 13.

**Tabela 13:** Resultados para a pesquisa de *Trichinella* das amostras de músculo analisadas

<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	<b>Conservação</b>	<b>Método de digestão</b>	<b>Observação</b>
<i>Canis lupus</i>	Bragança	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Canis lupus</i>	Bragança	Mau	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Canis lupus</i>	Fafe	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Canis lupus</i>	Desconhecido	Mau	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Canis lupus</i>	Monção	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Canis lupus</i>	Bragança	Mau	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Canis lupus</i>	Cinfães	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Canis lupus</i>	Arcos de Valdevez	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Canis lupus</i>	Arcos de Valdevez	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Canis lupus</i>	Boticas	Médio	negativo	só língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Sabugal	Mau	negativo	só língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Melgaço	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Melgaço	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Desconhecido	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Arcos de Valdevez	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Desconhecido	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Póvoa de Lanhoso	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Arcos de Valdevez	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Figueira de Castelo Rodrigo	Mau	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Desconhecido	Médio	negativo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Arcos de Valdevez	Médio	positivo	Músculo braquial e língua
<i>Vulpes vulpes</i>	Terras de Bouro	Médio	positivo	Músculo braquial e língua

Pela análise dos resultados do método de digestão da tabela 13 é possível observar que das 22 amostras analisadas, 9,09% (n=2) foram positivas, sendo somente registadas no músculo de raposa nas localidades de Arcos de Valdevez e Terras de Bouro.



**Fig. 33 e 34:** Larvas de *Trichinella* sp. colhidas em amostras de músculo de raposas. Ampliação de 100x (Fonte: original).

### 5.3. Parasitas da Pele

Nos casos suspeitos de sarna, analisaram-se 8 amostras, das quais 4 eram de lobo e as outras 4 de raposa, resultando em 8 casos positivos a ácaros do género *Sarcoptes* num estudo retrospectivo de 6 anos (2002 - 2008). As amostras foram colhidas em animais provenientes de 2 distritos: Viana do Castelo (4 concelhos e 7 amostras) e Braga (1 concelho e 1 amostra).

**Tabela 14:** Resultados da pesquisa de ácaros do género *Sarcoptes* das amostras de pele analisadas em raposa e lobo.

Espécies	Localidade	Estado de conservação	Sexo	Idade	Resultados	Alcateias
<i>Vulpes vulpes</i>	Melgaço	Bom	M	adulto	positivo ++	
<i>Vulpes vulpes</i>	Arcos de Valdevez	Bom	M	adulto	positivo +++	
<i>Vulpes vulpes</i>	Arcos de Valdevez	Bom	M	adulto	positivo ++	
<i>Canis lupus</i>	Arcos de Valdevez	Bom	M	subadulto	positivo +	Soajo
<i>Vulpes vulpes</i>	Ponte da Barca	Bom	F	adulto	positivo +++	
<i>Canis lupus</i>	Vila Verde	Mau	M	adulto	positivo +	Vila Verde
<i>Canis lupus</i>	Arcos de Valdevez	Médio	M	adulto	positivo +	Vez
<i>Canis lupus</i>	Monção	Bom	M	adulto	positivo +	Boulhosa

Na análise dos resultados da tabela 14 é possível observar que das 8 amostras analisadas duas apresentavam um grau muito elevado de infecção, as quais foram diagnosticadas em raposas, assim como também se poderá constatar pelas fotografias tiradas (Figuras).

Da totalidade os resultados apresentados, 87,5% (n=7) são de animais residentes do distrito de Viana do Castelo e 50% (n=4) dos casos são da localidade de Arcos de Valdevez.

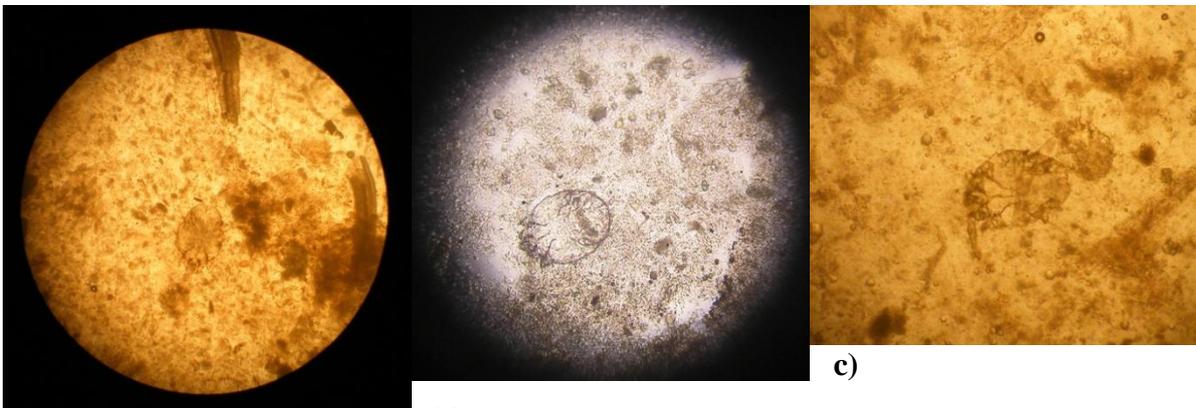


a)



b)

**Figs 36.:** Raposas com sarna sarcóptica a) Juvenil e b) Adulto (Fonte: Nuno Santos)



a)

b)

c)

**Figs.37:** *Sarcoptes scabiei* de amostras de pele de *Vulpes vulpes*: a) Ocular 10 x e objectiva 10 x; b) e c) Ocular 10 x e objectiva 40 x. (Fonte: Nuno Santos)



a)



b)

**Figs.38:** a) Cadáver de *Canis lupus* com sarna Sarcóptica, b) *Sarcoptes scabiei* de amostras de pele de *Canis lupus*, ocular 10 x e objectiva 10 x (Fonte: Nuno Santos).

## Capítulo 6 – Discussão

Os objectivos a que nos propusemos foram os seguintes: análise da prevalência global do parasitismo gastrointestinal nas três espécies de canídeos, comparação do parasitismo entre as três espécies e análise diferencial entre as diferentes alcateias de lobo. Os resultados foram obtidos através de técnicas coprológicas e técnicas de digestão artificiais.

Relativamente ao estudo coprológico, neste caso foram colhidas amostras (parasitológicas) a partir de necrópsias, com a obtenção de endoparasitas na fase adulta ou de amostras de fezes, para pesquisa de formas parasitárias microscópicas. A fase inicial de desenvolvimento dos parasitas, incluindo ovos e oocistos e larvas do sistema digestivo e respiratório, pode e deve ser observada através de amostras de fezes. Logo, para este trabalho foi exactamente o tipo de amostras escolhido para o rastreio de parasitas gastrointestinais e pulmonares, acrescentando ainda o tecido muscular e a pele, para o rastreio de parasitas do género *Trichinella* e ácaros da sarna, respectivamente. Deste modo, os métodos de estudo escolhidos têm a vantagem de serem não-invasivos, podendo fornecer dados parasitológicos em vastas áreas de distribuição dos mesmos (Balmori et al., 2000).

A coprologia parasitária aporta uma informação bastante fidedigna sobre a parasitofauna ainda que possua algumas limitações, nomeadamente, porque os dados de prevalência e sensibilidade são inferiores aos que são obtidos por necrópsia (Domínguez et al., 2002).

Os parasitas encontrados, ocasionam habitualmente infecções assintomáticas em animais saudáveis e bem alimentados, nomeadamente nos carnívoros silvestres. Todavia, quando submetidos a flutuações na sua alimentação surgem determinadas manifestações clínicas de acordo com o tipo de parasita presente. Deste modo, as infecções causadas por *Sarcocystis* e por alguns Céstodes são inespecíficas, mas as parasitoses causadas por Nemátodes podem causar diarreia grave, perda de peso, anemia (ancilostomídeos) e imunossupressão, que agravam as outras doenças, pondo em risco algumas populações de carnívoros silvestres com as suas altas taxas de prevalência.

### 6.1) Parasitas Gastrointestinais e Pulmonares

Trabalhos efectuados na Península Ibérica sobre parasitofauna de lobo e raposa, recorrendo a técnicas coprológicas, basearam-se em amostragens de diversos tamanhos, mas com semelhantes princípios. Relativamente a trabalhos somente com amostras de lobo destacam-se: Petrucci-Fonseca (1990) com 145 amostras, Balmori et al., (2000) com 60, Eduardo Santos (2000) com 99, Torres et al., (2000) com 26, Panadero et al., (2001) com 85, entre outros. À semelhança dos hospedeiros neste estudo, com amostras de lobo e raposa, refere-se

Torres et al., (2001) com 45 de raposas e 19 de lobo. No entanto, a maioria dos estudos efectuados apenas abrangem a helmintofauna, à excepção do Panadero et al., (2001) em que também foram contabilizados os protozoários e com prevalências mais elevadas em comparação com o presente estudo.

Curiosamente Segovia et al., (2001), num trabalho realizado em Espanha recorrendo à necrópsia de 47 lobos, constataram que 45 destes animais estavam parasitados, uma taxa de prevalência próxima dos 100%, embora neste caso represente uma diferença esperada em detrimento dos trabalhos efectuados mediante técnicas coprológicas. Assim como, foi concluído no trabalho de Torres et al., (2001), a coprologia mostra uma sensibilidade inferior à da necrópsia na detecção de maior parte dos helmintes digestivos em canídeos silvestres.

Neste trabalho, a amostragem englobou 284 amostras fecais, nas quais se encontraram formas parasitárias correspondentes a 72,9% do total examinado. No que se refere às espécies de canídeos, deste modo, o *C. lupus*, *V. vulpes* e *C. familiaris*, apresentaram resultados positivos em 68,3%, 84% e 69,2% das amostras, respectivamente.

Quanto aos diversos tipos de parasitas, os resultados não são muito diferentes aos já realizados. No presente trabalho foram identificados parasitas pertencentes a 16 géneros/espécies diferentes.

O predomínio de parasitas com ciclo biológico directo como o do género *Trichuris*, os *Ancylostomatidae*, os Ascarídeos e do género *Strongyloides*, pode estar relacionado com factores ambientais, com a época em que foram colhidas as amostras fecais e com as densidades populacionais dos hospedeiros. Além disto, a relação com outros carnívoros infectados pode favorecer a maior presença de parasitas com estes ciclos-biológicos directos e as suas probabilidades de contágio.

Os resultados relativamente à presença de formas parasitárias nas amostras fecais, foram mais elevados para os *Ancylostomatidae* (51,8%), seguindo-se os *Strongyloides* (27,8%) e em terceiro os Ascarídeos (*T. canis* – 12,3% e *T. leonina* – 5,3%). Isto poderá estar relacionado com a complexidade dos ciclos biológicos que leva à infecção das crias por parte das progenitoras, e ainda devido à abundância dos diversos hospedeiros, que são semelhantes entre os parasitas estudados. No entanto, os *Ancylostomatidae* destacam-se, em prevalência entre as três espécies de canídeos, de todos os outros parasitas, devido possivelmente, a factores de carácter epidemiológico, nomeadamente o número de ovos que uma fêmea produz, à migração somática das larvas com infecção galactogénica e transplacentária, a via de transmissão percutânea a partir do ambiente, a capacidade de desenvolvimento dos ovos no próprio ambiente e ao aumento gradual de resistência etária nos hospedeiros, tornando menos

provável a manifestação da doença clínica e maior a capacidade de propagação dos parasitas em causa.

Alguns aspectos do comportamento da raposa provavelmente favorecem a alta prevalência deste Nemátode nas respectivas amostras fecais, seja pela interacção directa entre indivíduos da mesma espécie, ou por contacto com fezes contaminadas, que desempenham um papel importante na definição de territórios e comunicação. A maior frequência varia de acordo com a dispersão e movimentos das raposas do sexo masculino durante a época de reprodução, permitindo um maior grau de exposição.

No que se refere ao aspecto zoonótico, importa destacar as espécies *Toxocara canis* e o *Ancylostoma caninum*, que são responsáveis por processos graves, frequentes e preocupantes, diagnosticados no homem como síndromes de larva migrante visceral e cutânea, respectivamente.

A raposa vermelha deve ser considerada como um importante reservatório de *Angiostrongylus vasorum* e helmintes que afectam as vias respiratórias, como *Eucoleus aerophilus* e *Crenosoma vulpis*, que também pode infectar cães domésticos. Deste modo, contrariando alguns estudos efectuados na Península Ibérica, Eira et al. (2006), Barbosa et al. (2005), Torres et al. (2001), o *A. vasorum* não foi identificado neste trabalho. Os moluscos (lesmas e caracóis de água) actuam como hospedeiros intermediários obrigatórios de *A. vasorum* e os sapos podem também constituir hospedeiros paraténicos. A falta de disponibilidade do hospedeiro intermediário, em comparação com outros mais adequados, como presa destes canídeos, provavelmente explica as diferenças entre as prevalências (Eira et al., 2006).. No presente estudo, dentro dos parasitas pulmonares só foi encontrado o *Eucoleus aerophilus* no lobo e na raposa

O *Eucoleus aerophilus* é um parasita do sistema respiratório de diversos carnívoros e bem patente na Península Ibérica, embora tenha sido mais evidenciada a sua presença em Portugal do que em Espanha. Este parasita tem sido muito descrito na raposa, como o principal causador de pneumonias na presença de elevadas cargas parasitárias (Pence e Custer, 1981). Apesar desta referência, os resultados deste trabalho, ainda mostram uma taxa de prevalência mais elevada para o lobo-ibérico. A detecção deste parasita é um forte indicador de que o lobo-ibérico e a raposa ingerem, pelo menos esporadicamente anelídeos, embora não haja referências da presença deste recurso alimentar em estudos sobre a dieta destes dois canídeos silvestres em Portugal (Roque et al., 2001).

Em relação aos Céstodes, muitos dos resultados obtidos por investigadores puseram a descoberto a fidelidade da coprologia parasitária que é maior para os Nemátodes do que para os Céstodes (Torres et al., 2000). Com isto, a baixa frequência de parasitismo por estes

últimos pode ser atribuída a este factor, assim como ao método de estudo aplicado, que demonstra uma baixa sensibilidade, podendo comprometer a integridade dos anéis grávidos, o que resulta numa baixa presença de ovos livres nas fezes (Thompson et al., 2001). Contudo, com os dados sobre a alimentação destes canídeos e com base nos hospedeiros intermediários dos parasitas da família *Taeniidae*, acredita-se que a sua presença deveria ser mais elevada que a encontrada. Segundo alguns estudos efectuados, Eira et al. (2006), pode mesmo concluir-se que é frequente a presença de coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus*) na dieta dos canídeos silvestres, nomeadamente em raposas, com conseqüente surgimento de *Taenia sp.* Deste modo, deveria de haver resultados positivos deste parasita para raposa e que curiosamente foi o único canídeo sem nenhum resultado. Por outro lado, tanto no lobo como no cão houveram amostras positivas, mas com baixas taxas de prevalência. Contudo, a susceptibilidade das raposas, com destaque para a *T. pisiformis*, limita-se basicamente aos filhotes, enquanto outros carnívoros parecem ser hospedeiros mais apropriadas para este parasita comparativamente com a raposa. Portanto, o ciclo de vida da *Taenia* pode depender, principalmente da infecção de cães e gatos vadios.

Outros estudos relataram prevalências semelhantes destes Céstodes em raposas em determinadas zonas da Europa. Segundo Segovia et al. (2004), a *T. pisiformis* não foi detectada na Reserva Natural da Serra da Malcata (Portugal), no entanto, foi identificada uma prevalência de 10,5% no sul da Espanha.

A baixa frequência deste parasita pode justificar-se, provavelmente pela menor existência de coelho bravo na área em estudo.

Neste trabalho não foi possível a identificação dos géneros dos parasitas pertencentes à família *Taeniidae* através dos ovos, por causa das suas semelhanças e sobreposição das suas medidas. Dependendo da espécie pode causar problemas graves no hospedeiro, incluindo a má nutrição e perda de peso (Dominguez, 2002). Perante estas condicionantes e de acordo com outros estudos efectuados, a presença destes parasitas deverá ser muito provavelmente, um reflexo da dieta destes canídeos, não havendo razão especial que demonstre a ausência dos mesmos nas amostras fecais de raposa.

A ausência de tremátodes, nomeadamente da *Alaria alata*, deve-se, possivelmente à época do ano em que foram colhidas as amostras e à baixa frequência das superfícies aquáticas, uma vez que o ciclo de vida deste parasita inclui os caracóis aquáticos como hospedeiros intermediários, assim como os anfíbios. Apesar deste resultado, num estudo realizado em Dunas de Mira, Portugal, este foi o parasita mais prevalente, o que mais uma vez se poderá concluir a importância da presença de água superficial para o ciclo deste tremátode. Os anfíbios são, raramente consumidos em Dunas de Mira (1,34% na dieta da raposa). No

entanto, a alta prevalência de *A. alata* indica, então, que uma proporção significativa de procura abundante deste tipo de animais no local por parte das raposas, provavelmente porque outros tipos de presas estão indisponíveis (Eira et al., 2006).

Esta situação nunca tinha sido identificada em estudos anteriores, contudo Segovia et al. (2004) descreve taxas de prevalência de 19,2% na Serra da Malcata (Portugal) e 15,8% no Sul da Espanha. Este parasita é extremamente raro em seres humanos, mas é considerado um potencial agente zoonótico em todo o mundo (Eira et al., 2006).

A prevalência do *Sarcocystis canis* (5,3%) demonstra a fácil difusão por parte destes parasitas entre os hospedeiros, onde se perpetua a sua relação de forma muito específica. Não obstante a dificuldade na classificação dos oocistos por espécies, não impede o conhecimento, através do ciclo biológico, das possíveis presas na dieta do lobo (Domínguez et al., 2002). Assim, na Sarcosporidiose, tanto o homem como os canídeos silvestres são hospedeiros definitivos, infectando-se ambos pelo consumo de carne de bovino ou suíno (Domínguez et al., 1999).

No caso dos hospedeiros definitivos silvestres, o *Cystoisospora*, presente com uma taxa de prevalência de 3,5%, é uma coccídea típica por provocar diarreias sanguinolentas, atacando fundamentalmente o intestino dos indivíduos juvenis. Este parasita foi citado pela primeira vez num estudo de Balmori et al., (2000) de endoparasitas na Península Ibérica. Logo a distribuição deste parasita pode ter sido influenciada pela densidade de juvenis entre os grupos de canídeos em estudo, sendo esta situação mais evidenciada no cão doméstico.

No género *Cryptosporidium* o interesse era detectar, da forma mais rápida, as amostras positivas. Deste modo, utilizou-se o método de coloração de esfregaços fecais por Ziehl-Neelsen modificado, uma vez que é económico e fácil de realizar. No entanto, os resultados foram sempre confirmados pela medição dos oocistos nestes esfregaços fecais aquando da observação ao microscópio. A imunofluorescência foi aplicada em alguns casos mais duvidosos, uma vez que nestas condições é uma técnica mais sensível comparativamente à anterior. Em relação à limitação de amostras é importante referir que algumas amostras não foram incluídas nesta parte, uma vez que segundo a ordem cronológica das análises em laboratório, esta técnica foi das últimas a ser executada, logo só foram processadas 276 amostras, sendo que 8 estavam esgotadas.

O *Cryptosporidium* tem sido cada vez mais assinalado em espécies silvestres (Hunter et al., 2005). Contudo, pouco se sabe sobre a prevalência destes parasitas nestes mesmos canídeos. Neste estudo a raposa destaca-se com maior taxa de prevalência (22,1%) comparativamente ao lobo (13,5%). Este valor pode estar inerente à vulnerabilidade deste canídeo para com o *Cryptosporidium* ou devido ao maior contacto da raposa com os ruminantes domésticos. No que diz respeito ao cão doméstico, o valor da taxa de prevalência (13,5%) também é menor

em relação à raposa, porque apesar do maior risco de contágio, aquele apresenta uma dieta mais controlada e conseqüentemente, contactam com recursos alimentares menos contaminados.

Os protozoários do género *Eimeria* afectam geralmente os Mamíferos, Herbívoros e Aves, de tal modo que a sua presença não parece ser uma parasitose característica dos canídeos silvestres, sendo antes causada por um fenómeno de predação sobre os hospedeiros característicos do ciclo biológico desta coccídea, tais como os ovinos, suínos, coelhos e aves de capoeira (Domínguez et al., 2002). O mesmo tipo de fenómeno estará na origem de outros parasitas, tais como *Sarcocystis felis*, *Moniezia* sp., *Nematodirus* spp., *Anoplocephala* spp. e *Paranoplocephala* sp. Relativamente a estes dois últimos géneros, normalmente associados aos equídeos, denota-se a sua presença no espectro alimentar dos canídeos silvestres, em particular no lobo. Deste modo, destaca-se em particular a predação exercida pelos lobos nos garranos.

Relativamente à comparação da distribuição dos parasitas pelas 7 alcateias, destaca-se a de Castro Laboreiro com uma taxa de prevalência muito elevada (80%). Esta situação pode estar relacionada com a densidade populacional do lobo-ibérico nesta zona.

A menor diversidade de parasitas a sul do rio Douro deve-se à dieta do lobo-ibérico, uma vez que a norte do mesmo é maior a predominância de javali, de ruminantes silvestres e de equinos (essencialmente, garranos) (Roque et al., 2001). Por outro lado, a sul do rio Douro as prevalências dos parasitas do género *Eimeria* e da família da *Taeniidae* nas amostras fecais destacam-se em comparação com as prevalências médias nas amostras colhidas nas alcateias situadas a norte, podendo esta situação estar influenciada pela maior probabilidade de interacção do lobo com os ruminantes domésticos. Apesar da grande diferença de distribuição da diversidade de parasitas, este factor em nada interferiu com a distribuição quantitativa destes, tanto a norte como a sul do rio Douro.

Por fim, no que se refere à percentagem de parasitismo simples e múltiplo, os resultados são semelhantes a outros trabalhos, já referidos anteriormente, levados a cabo na Península Ibérica, que também obtiveram valores acima dos 50% (Balmori et al., 2000) ao contrário de outros estudos realizados em Portugal, como o de Petrucci-Fonseca (1990) e o de Eduardo Santos (2001), que revelaram valores inferiores.

Relativamente ao último trabalho efectuado em canídeos silvestres, nomeadamente em raposa, no nosso País, revela um incremento global dos parasitas gastrintestinais, com especial destaque para os *Ancylostomatidae* (Eira et al., 2006).

Assim, pensa-se que este trabalho revela que estes agentes junto do seu aumento, da sua patogenia e da sua importância em Saúde Pública, devem ser motivo de mais estudos e trabalhos de vigilância sanitária.

## **6.2) Parasitas musculares**

### **Género *Trichinella***

A respeito da técnica parasitológica, o método de digestão artificial preenche os seguintes requisitos como a sensibilidade, exequibilidade e celeridade para o tipo de informação que se pretende obter.

Relativamente à sensibilidade do método, a quantidade de tecido muscular utilizada para a detecção de larvas de *Trichinella* nos métodos directos, deve ser adaptada para o nível de sensibilidade escolhido (Nöckler *et al.*, 2000 in Magalhães, 2003). Ou seja, optou-se por digerir 10 g de amostra em função da disponibilidade de amostra possível e também por representar a quantidade mínima exigida para a detecção de larvas de *Trichinella* em amostras de carne, segundo o Regulamento (CE) n.º 2075/2005 da Comissão, de 5 de Dezembro de 2005, Anexo III, que estabelece regras específicas para os controlos oficiais de detecção destas larvas na carne de caça selvagem (JO L 338 de 22.12.2005, p. 60. Regulamento alterado pelo Regulamento (CE) n.º 1665/2006 (JO L 320 de 18.11.2006, p. 46).

Num estudo de Pozio *et al.*, (2009) que teve como objectivo reunir informações detalhadas sobre os hospedeiros de *Trichinella* e do seu habitat em muitos países da Europa, com base nos registos da base de dados do ITRC (International *Trichinella* Reference Centre) nos últimos 20 anos, pode concluir-se que em Portugal apenas foi detectado a *T. britovi*, em 7 amostras isoladas e unicamente em canídeos silvestres. Este facto mostra que em Portugal estes animais representam importantes reservatórios, assim como em muitos países da Europa, o que realmente se pode constatar pela prevalência de 41,1% de *T. britovi* nesta espécie de animais. Ao contrário da *T. spiralis*, que apenas apresenta maior prevalência para os javalis no quadro geral registado na Europa, mas particularmente em Portugal nenhum caso foi isolado nos últimos 20 anos. Este estudo também sugere que é maior a susceptibilidade de larvas de *T. spiralis* em países com temperaturas mais baixas do que para a *T. britovi*. Tanto a *T. spiralis* como a *T. britovi* circulam em áreas de floresta e seminaturais e em áreas agrícolas, enquanto a sua circulação em locais domésticos é desprezível (Pozio *et al.*, 2009).

No presente estudo, não foi possível chegar à espécie de *Trichinella*, mas entre as duas espécies de canídeos estudadas, o lobo e raposa, esta última caracteriza-se como um carnívoro oportunista, tanto pela sua população como pela sua dispersão geográfica no território, sendo o melhor indicador da distribuição da triquinose silvática em Portugal. Previsivelmente, os

resultados obtidos confirmam então, a raposa como o principal reservatório, uma vez que em 22 amostras analisadas, 9,1% (n=2) foram positivas, todas de raposa. Estes resultados foram identificados em amostras de animais provenientes das localidades de Arcos de Valdevez, distrito de Viana do Castelo e de Terras de Bouro do distrito de Braga. Esta proporção é maior relativamente a outro trabalho realizado em Portugal, como o de André Magalhães (2003) com a proporção de 4,9% (n=10) de casos positivos no total de 207 amostras de raposa, apesar serem amostras provenientes da Beira Interior, no entanto a área de estudo também abrangia a zona do PNPG. E ainda, 3,8% de prevalência global na ordem *Carnivora*, destacando a raposa-vermelha como um importante e específico reservatório de *Trichinella* em Portugal. Este canídeo pode encontrar-se de norte e a sul do país, desde as zonas planálticas e montanhosas, passando pelas regiões do litoral, até às planícies alentejanas (Magalhães, 2003). Assim, a distribuição deste parasita a nível nacional poderá estar influenciada também pela distribuição deste hospedeiro.

No entanto, estes valores são inferiores aos mencionados em alguns estudos na Europa em raposa. Deste modo, destacam-se as taxas de prevalência de 10 a 90%, conforme se trate de *T. spiralis* e *T. britovi*, respectivamente (Pozio et al., 2009).

Finalmente, é de destacar que segundo Magalhães (2003), a *Trichinella britovi* também foi isolada em 3 amostras de lobo em Vila Verde, Terras de Bouro e Bragança. Ainda no mesmo trabalho foi mencionada a lontra com uma prevalência de 50% para *Trichinella* sp no distrito de Bragança.

### **6.3) Parasitas da pele**

A sarna sarcóptica tem sido citada em 10 ordens, 27 famílias e 104 espécies de mamíferos domésticos e silvestres (Pence e Ueckermann, 2002).

A sarna sarcóptica causa epidemias que resultam numa taxa de mortalidade significativa em várias populações de animais silvestres, incluindo canídeos, felídeos, suínos, primatas e bovinos (Ueckermann e Pence, 2002), e faz parte de um número crescente de doenças infecciosas emergentes da “vida selvagem” (Daszak et al., 2000 in Rabinowitz e Gordon, 2004). Tais doenças podem figurar em populações silvestres como reservatórios para a população animal doméstica ou para os humanos e/ou o inverso.

No que se refere às epidemias da sarna sarcóptica em espécies animais, estas têm sido, recentemente actualizadas. A epidemiologia da sarna sarcóptica parece diferir entre diversas áreas geográficas e populações de hospedeiros. Como já foi referido os efeitos a curto prazo de uma infecção de sarna, podem ter um impacto significativo sobre uma população de animais silvestres. Por exemplo, refere-se a alta prevalência em raposas na Europa o que pode

levar à redução drástica da raposa vermelha por mais de 70% (Sréter et al., 2003), como aconteceu às populações deste carnídeo na Suécia no ano 1970, com uma redução de 90% da população; ficando à beira da extinção neste País (Balestrieri et al., 2006). No entanto, por vezes, as aparências podem divergir em termos das consequências de uma epidemia de sarna em espécies silvestres, cujos números são suficientes para sustentar a população embora pareça conduzir devastadoramente a perdas elevadas (Pence et al., 2002).

No geral como a transmissão é por contacto directo e indirecto, a sarna tende a ser dependente da densidade populacional dos animais em causa.

Em consequência do aumento dos casos isolados de sarna identificados em diferentes hospedeiros, a doença pode atingir proporções de epidemia em algumas populações de animais silvestres, devido muitas vezes, ao contacto com as espécies domésticas. Deste modo, dá-se especial destaque aos casos do lobo-ibérico e da raposa-vermelha na Europa.

Apesar de haver “linhagens” de ácaros para diferentes espécies de hospedeiros, pode ocorrer a transmissão cruzada. O risco das estirpes de ácaros de animais que infectam os humanos aumenta com o grau do contacto homem-animal, o que se tem vindo a registar cada vez mais (Rabinowitz<sup>1</sup> e Gordon, 2004). Estudos já efectuados referem a infecção dos seres humanos com o *Sarcoptes* de estirpes de outros mamíferos, incluindo bovinos (Mumcuoglu e Rufli, 1979), cães e gatos (Warner, 1984), algumas espécies de marsupiais (Skerratt e Beveridge, 1999) e suínos.

Em Portugal são poucos os dados de sarna nestes animais, no entanto têm surgido ocasionalmente casos em animais silvestres que aparecem mortos. Atendendo às observações de alguns estudos, os animais silvestres infectam-se maioritariamente por contacto com os animais domésticos.

Neste estudo são apresentados 8 resultados de amostras de pele de lobo e raposa registados entre 2002 e 2008. Nas amostras analisadas, as de raposas são as que registam maior grau de infecção. Os casos positivos incidem em animais que habitavam a região do Minho, nomeadamente, no distrito de Viana do Castelo (87,5%), e 50% da totalidade dos resultados foram observados em amostras de animais da localidade de Arcos de Valdevez. Contudo, houve ainda um resultado registado num lobo na localidade de Vila Verde no distrito de Braga.

No entanto, as taxas de prevalência podem ser subestimadas devido à presença de doenças crónicas ou formas subclínicas, que não são facilmente detectáveis mesmo por meio de raspagem de pele (Balestrieri et al., 2006).

## Capítulo 7 - Conclusões

Da discussão anterior e da análise da bibliografia consultada, verifica-se que os resultados obtidos são em grande parte consentâneos, no que diz respeito à identificação de maior parte dos parasitas encontrados, isto comparativamente com as mais recentes investigações realizadas, principalmente na Península Ibérica. No entanto, divergiram a identificação de alguns helmintes de ruminantes e equinos, correspondendo aos comportamentos de predação destes canídeos silvestres. Não obstante, os valores de prevalência divergiram em maior proporção, um facto esperado neste estudo, uma vez que as amostras foram colhidas num curto espaço temporal e mesmo algumas já não apresentavam um bom estado de conservação. Deste modo, neste trabalho foram identificados 16 famílias/géneros/espécies de parasitas na totalidade de 284 amostras fecais de lobo-ibérico (n=164), raposa-vermelha (n=81) e cão doméstico (n=39). Entre os parasitas gastrintestinais destacaram-se os *Ancylostomatidae* (51,8%), seguindo-se o género *Strongyloides* (27,8%), os ascarídeos com duas espécies *Toxocara canis* (12,3%) e o *Toxascaris leonina* (5,3%). Embora com menor taxa de prevalência, ainda dentro dos parasitas gastrintestinais foi identificado o *Trichuris* (3,9%), que de acordo com os hospedeiros em causa serão Nemátodes da *T. vulpis*.

Em relação aos parasitas respiratórios, só foi identificada uma espécie, o *Eucoleus aerophilus* com uma prevalência de total de 3,5%.

No que diz respeito às coccídeos, foram observadas 5 géneros/espécies, destacando-se o *Cryptosporidium* (15,9%), seguido da *Eimeria* (6,7%), do *Sarcocystis canis* (5,3%), do *Cystoisospora* (3,5%) e curiosamente o *Sarcocystis felis* (0,4%), único caso registado no lobo-ibérico.

Os outros géneros identificados (*Nematodirus*, *Moniezia*, *Anoplocephala* e *Paranoplocephala*) apresentaram pouca expressão, contudo é curiosa a sua identificação, porque confirma o fenómeno de predação dos hospedeiros definitivos em causa figurado em determinados estudos apresentados sobre os recursos alimentares dos canídeos silvestres.

Em conclusão, e como tópico final, realça-se que a maioria dos parasitas isolados dos cães domésticos e dos canídeos silvestres que partilham o mesmo habitat são de origem alimentar e são importantes para saúde pública e, portanto, devem ser monitorizadas medidas de controlo das espécies pecuárias na região Norte de Portugal de regime extensivo, uma vez que se aproximam a grande passo a interconexão entre as espécies silvestres, que constituem os principais reservatórios e consequentemente os principais vectores de doenças parasitárias.

No entanto, é notável que este tipo de controlo seja muito difícil, especialmente nas regiões rurais. Em vez de aceitar que todas as doenças infecciosas são inevitáveis, temos de perceber que muitas são facilmente controláveis com um custo mínimo.

A educação e mudança de atitude podem fazer toda a diferença entre a vida com medo do inimigo e que vivem em condições de igualdade com ele. Além disso, é necessário que as autoridades de saúde pública, os proprietários dos animais de estimação, os médicos e veterinários da região prestem mais atenção a esta questão.

Na relação dieta *versus* existência de parasitas regista-se uma utilização do mesmo espaço-temporal e hábitos alimentares dos canídeos silvestres e ungulados domésticos. Isto confirma-se com os resultados devido à existência de parasitas destes últimos nas fezes de lobo e raposa, constituindo estes importantes reservatórios.

Na comparação dos resultados das amostras de fezes de carnídeos silvestres *versus* domésticos, confirma-se, então a contaminação destes últimos. Registou-se um impacto inferior de contaminação, como era esperado, uma vez que os cães são de caçadores e de pastores e portanto, alguns estariam desparasitados. Contudo, este facto remete-nos para a importância da pesquisa e monitorização de protocolos de desparasitação em carnívoros domésticos, uma vez que também representam potenciais ameaças para a contaminação dos carnívoros silvestres.

Quanto à percentagem de infecções simples e múltiplas, destacaram-se estas últimas com uma taxa acima dos 50%, caso pouco evidenciado em estudos efectuados em Portugal.

Na distribuição dos parasitas pelas 7 alcateias identificadas para este caso, assim evidenciou-se a alcateia de Castro Laboreiro (80%), contudo a alcateia a sul do rio Douro apresentou uma distribuição semelhante às outras 6, com localização a norte deste mesmo rio, em termos de classificação quantitativa. Ao contrário, numa avaliação qualitativa, a diversidade de parasitas foi menor na alcateia de Leomil.

Na pesquisa da *Trichinella spp*, verifica-se que os resultados obtidos estão de acordo com as mais recentes investigações realizadas em outros países da União Europeia. Deste modo, conclui-se que a Triquinelose silvática está bem disseminada em Portugal Continental, nomeadamente no Minho, pois no presente estudo a prevalência global foi cerca de 9,1% em amostras da região do Arcos de Valdevez e Terras de Bouro, distritos de Viana do Castelo e Braga, respectivamente.

De acordo com todos os dados e resultados apresentados pode concluir-se que na Europa, os animais silvestres representam os mais importantes reservatórios dos parasitas pertencentes ao género *Trichinella*, o que torna a erradicação impossível e explica porque os parasitas continuam a circular, embora a prevalência nos animais silvestres tenha sido muito baixa durante muitos anos (Rafter et al., 2005 & Hars et al., 2007 em Pozio et al., 2009). Os animais silvestres também representam a mais importante fonte de infecção para suínos, que por sua

vez são a principal fonte de infecção para outros animais domésticos (por exemplo, cavalos), bem como para os seres humanos (Poizio & Murrell, 2006).

Por fim, e na ordem de um estudo retrospectivo de 6 anos, são citadas 8 amostras (50% em lobo-ibérico e 50% em raposa) em que duas apresentavam um grau muito elevado de infecção, as quais foram diagnosticadas em raposas. A maioria dos casos positivos incide em animais que habitavam a região do Minho, nomeadamente, no distrito de Viana do Castelo (87,5%) e um resultado registado num lobo na localidade de Vila Verde, distrito de Braga (12,5%). Com isto, pode concluir-se a maior susceptibilidade da raposa para a sarna causada pelo agente *Sarcoptes scabiei*.

## Capítulo 8 - Referências Bibliográficas

- Acedo, C.S., Quílez, J., Cacho, E. (1999). Cestodosis: teniosis, equinococosis, metacestodosis y difilobotriosis. In M.C. Del Campillo, F.A. Vazquez, A.R.M. Fernandez, M.C.S. Acedo, S.H. Rodriguez, I.N. Lopez-Cozar, P.D. Baños, H.Q. Romero & M.C.Varela, *Parasitología Veterinaria*. (pp.626-636). Madrid, Espanha: McGraw-Hill-Interamericana de España.
- Alvarez, F., Iglesias, R., Bos, J., Rey, J., Sanmartin Durán, M.L. (1991). Lung and hearth nematodes in some Spanish mammals. *Wiad Parazytol* 37(4):481-90.
- Appelbee, A.J., Thompson. R.C.A., Olson, M.E. (2005). Giardia and Cryptosporidium in Mammalian Wildlife. The Current Status and Future Needs. *Trends Parasitol*. (in press).
- Aubert, M. (1994). Control of rabies in foxes: what are the appropriate measures? *Veterinary Record* 134: pp 55-59.
- Balestrieri, A., Remonti, L., Ferrari, N., Ferrari, A., Valvo, T., Robetto, S., Orusa, R. (2006). Sarcoptic mange in wild carnivores and its co-occurrence with parasitic helminths in the Western Italian Alps. *Eur J Wildl Res* (2006) 52: pp 196–201.
- Balmori, A., Rico, M., J. Naves, J., & Llamazares E. (2000). Contribución al estudio de los endoparásitos del lobo en la Península Ibérica: una investigación coprológica. *Galemys*, 12 (n. e.): 13-26.
- Baños, P.D., Baños, N.D. & Pelayo, P.M. (1999). Nematodosis: toxocarosis, toxascarosis, ancilostomosis, tricuriasis, estrogiloidosis, espirocercosis y olulanosis. In M.C. Del Campillo, F.A. Vazquez, A.R.M. Fernandez, M.C.S. Acedo, S.H. Rodriguez, I.N. Lopez-Cozar, P.D. Baños, H.Q. Romero & M.C.Varela, *Parasitología Veterinaria*. (pp.636-651). Madrid, Espanha: McGraw-Hill-Interamericana de España.
- Baños, H.Q. Romero & M.C.Varela, *Parasitología Veterinaria*. (pp.615-617). Madrid, Espanha: McGraw-Hill-Interamericana de España.
- Barbosa, A. M., Segovia, J.M., Vargas, J.M. Torres, J., Real, R., Miquel, J. (2005). Predictors of Red FOX (*Vulpes vulpes*) Helminth Parasite Diversity in the Provinces of Spain. *Wildl. Biol. Pract.*, (1): pp 3-14.
- Barker, I.K.; Carbonell, P.L. (1974). *Cryptosporidium agni* sp. n. from lambs and *Cryptosporidium bovis* sp. n. from a calf with observations on the oocyst. *Parasitology Research*, vol.44: pp. 289-298.
- Barwick, R.S., Mohammed, H.O., White, M.E., Bryant, R.B. (2000). Detection of *Cryptosporidium parvum* and *C.muris* in soil samples. *Biol. Fertil Soils*, 31: pp 385-390.
- Bowman, D.D., Lynn, R.C., Eberhard, M.L. & Alcaraz, A. (2009). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. (9 th ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Co.

- Carvalho-Varela, M (1988/1989) Importance des études parasitologiques dans la faune sauvage. *Anais da Faculdade de Medicina Veterinária (Lisboa)* 25/26: pp 133-143.
- Cerbo, A.R., Manfredi, M.T., Bregoli, M., Milone, N.F., Cova, M. (2008). Wild carnivores as source of zoonotic helminths in north-eastern Italy. *Helminthologia*. 45, 1: 13 – 19.
- Cordero del Campillo, M, Argüello, M.R.H. (1999). Parasitosis del aparato digestivo del perro y del gato: Trematodosis del hígado y del páncreas. In: *Parasitología Veterinaria*. M. Cordero del Campillo y F. A. Rojo Vázquez (eds.). McGraw-Hill Interamericana, Madrid 968 pp.
- Corrales, G.M. (1999). Coccidiosis (s.I.). Amebosis. Balantidiosis. In M.C. Del Campillo, F.A. Vazquez, A.R.M. Fernandez, M.C.S. Acedo, S.H. Rodriguez, I.N. Lopez-Cozar, P.D., Baños, H.Q. Romero & M.C.Varela, *Parasitología Veterinaria*. (pp.756-780). Madrid, Espanha: McGraw-Hill-Interamericana de España.
- Corrales, G.M. & Bautista M.G. (1999). Angiostrongilosis. Aelurostrongilosis. Filaroidosis. Otras Nematodosis respiratorias de carnivoros. In M.C. Del Campillo, F.A. Vazquez, A.R.M. Fernandez, M.C.S. Acedo, S.H. Rodriguez, I.N. Lopez-Cozar, P.D. Baños, H.Q. Romero & M.C.Varela, *Parasitología Veterinaria*: pp.695-699.
- D.L. 187/71, de 8 de Maio, [D.R. N° 108 1ª Série, de 8 de Maio de 1971]
- Despommier, D. (2003). Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(2): pp 265-272.
- Domínguez, G. & Torre, J.A. (2002). Aportaciones al conocimiento de los endoparásitos del lobo ibérico (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) en el norte de burgos. *Galemys*, 14 (2): 49-58.
- Duncan, R. B., Caudell, D., Lindsay, D. S. and Moll H. D., (1999). Wildlife Disease Association 1999 - Cryptosporidiosis in a Black Bear in Virginia; *Journal of Wildlife Diseases*, 35(2): pp. 381–383.
- Dunn, R.A., Greiner, E.C. (2005). Managing Hookworms in the Landscape [versão electrónica]. *Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida*. Acedido em Abr. 4, 2008. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/NG007>.
- Eira, C., Vingada, J., Torres, J., Miquel, J. (2006). The Helminth Community of the Red fox, *Vulpes vulpes*, in Dunas de Mira (Portugal) and its effect on host condition. *Wildl. Biol. Pract.*, 2(1): 26-36
- FAO Agriculture Department Animal Production and Health Division. [versão electrónica]. Disponível em : <http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/multimedia.html>.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol*, 126: pp 37–56.
- Fonseca, I.M. (2000). Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: caracterização genética de isoladores de *Cryptosporidium parvum* de origem bovina.

- Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Medicina Veterinária – UTL. Lisboa: pp 1-69.
- Foreyt, William J. (2001). *Veterinary Parasitology reference manual*. 5ª ed.
- Gamble, H. R. *et al* (2000). Internacional Commission on Trichinellosis (ICT) – Recommendations on Methods for the Control of *Trichinella* in Domestic and Wild Animals Intended for Human Consumption – prepared by the ICT Standards for Control Guidelines Committee, *Veterinary Parasitology*, 93: pp 393-408.
- Gottstein, B., Pozio, E., Nockler, C. (2009). Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 127–145.
- Gregory S., Pietsch, L., Gary, A. L., Stromberg, B. Wildlife Disease Association (2002). Aberrant *Toxocara canis* in a Red Fox. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), pp. 219–220
- Guimarães, A.M., Alves, E.G.L., Rezende, G. F., Rodrigues, M. C. (2005). Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG *Toxocara* sp. eggs and *Ancylostoma* sp. Larva in public parks, Brazil. *Revista saúde pública*, 39 (2): 293-295.
- Holland, C.V., Smith, H.V. (2006). *Toxocara: the enigmatic parasite*. CABI publishing, Cambridge: pp 18-41.
- Hunter, P.R, Thompson, R.C.A. (2005). The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology* 35: pp 1181–1190.
- International Trichinella Reference Center. The database of *Trichinella* strains. [versão electrónica]. Acedido em 15 Setembro, 2009. Disponível em: <http://www.iss.it/site/Trichinella/index.asp>.
- Jenkins, D.J., Romig, T., Thompson, R.C.A. (2005). Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.—a global update. *International Journal for Parasitology*, 35: pp 1205–1219.
- Kassai, T., Cordero del Campillo, M., Euzéby, J., Gaafar, S., Hiepe, Th., Himonas, C.A. (1988). *Veterinary Parasitology*, 29: 299-326.
- León-Vizcaíno, L., Ybáñez, M.R., Cubero, M.J., Ortíz, J.M., Espinosa, J., Pérez, L., Simón, M.A. & Alonso, F. (1999) Sarcoptic mange in Spanish Ibex from Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(4), pp. 647–659
- Madeira de Carvalho, L.M., Pereira da Fonseca, L.M., Gomes, L., Meireles, J.M. (2009). Lungworms in domestic and wild carnivores in Portugal: rare parasites or rarely diagnosed? CIISA/FMV/UTL. Fórum on carnivore lungworms, Porto, 9 de Setembro 2009.

- Morgan, E.R., Tomlinson, A., Hunter, S., Nichols, T., Roberts, E., Fox, M.T., Taylor, M.A. (2008). *Angiostrongylus vasorum* and *Eucoleus aerophilus* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. *Vet Parasitol* 154(1-2): pp 48-57.
- Sloss, M.W., Zajac, A.M. e Kemp, R.L.. (1999). *Parasitologia Clínica Veterinária*. Editora Manole LTDA. Sexta edição. pp 33.
- Macdonald, David. (2001). *The Encyclopedia of Mammals*. Oxford. pp 42-47, 54-61.
- Mackenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Grandud, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. R., Davis, J. P. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, 331: pp 161–167.
- Magalhães, A. S. T. (2003). Contribuição para o estudo da triquinelose Silvática em Portugal Continental. Tese de Mestrado em Saúde Pública Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária – UTL, Lisboa, 107 pp.
- Maroco, J., Bispo, R. (2005). *Estatística aplicada às Ciências Sociais e Humanas*. Lisboa. Climepsi editores:127-136, 151-201.
- Minderico, M.M.T. (1998) - Contribuição para o estudo do parasitismo gastrointestinal e pulmonar do cavalo numa exploração coudélica da Azambuja. Relatório do Trabalho de Fim de Curso, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 113 pp.
- Miquel, J., Torres, J., Casanova, J.C. & Feliu, C. (1994). *Helminths parasites of carnivores silvestres a Catalunya. Particularitats de les faunes del Montseny*. 166 pp. Treballs del MDG-CCNN. Granollers, Museu de Granollers.
- Morgan, E.R., Tomlinson, A., Hunter, S., Nichols, T., Roberts, E., Fox, M.T., Taylor, M.A. (2008). *Angiostrongylus vasorum* and *Eucoleus aerophilus* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. *Veterinary Parasitology*, 154, 48–57.
- Muirhead, R. H., Gallagher, J. & Burn, K. J. (1974). Tuberculosis in wild badgers in Gloucestershire: epidemiology. *Veterinary Record*, 95, 552-5.
- Nabais, P. M. D. (2008). Controlo de Helmintoses Gastrointestinais em cães. Dissertação de Mestrado Integrado em Clínica de Medicina Veterinária, Faculdade de medicina de Veterinária – UTL, Lisboa, pp 3 – 48.
- O’Donoghue, P.J. (1995). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25, 139-195, 525–530
- OIE *Manual*. ( 2005). Hookworms. pp 1-6.
- OIE *Terrestrial Manual* 2008 – “ Mange”; chapter 2 . 9 . 8 . ; p. 1255-1266.
- Panadero, R., Sánchez-Andrade, R., Pedreira, J., Paz, A., Suárez, J.L., Díez-Banõs, P. (2001). Estado de la infección parasitaria del lobo (*Canis lupus*) en el sur de Galicia. *Acta Parasitologia Portuguesa* 8 (2), 177.
- Pence, D.B. (2002). Sarcoptic mange in wildlife. *Ueckermann ano*, vol.:21 iss 2: 385-398.

- Pence, D.B. & Custer, J.W. (1981). Host-parasite relationships in wild canids of North America. II. Pathology of infectious diseases in the genus *Canis*. Pp.760-844 in Chapman, J.A. & Pursley, D. (Eds.) *Worldwide Furbearer Conference proceedings Falls Church, R.R. Donnelley & Sons Co.*
- Petrucci-Fonseca, F. (1990). O lobo (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) em Portugal. Problemática da sua conservação. 393 pp. Tese de Doutoramento, Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Pimenta, V., Barroso, I., Álvares, F., Correia, J., Ferrão da costa, G., Moreira, L., Nascimento, J., Petrucci-Fonseca, F., Roque, S., Santos, E. (2005). Situação Populacional do lobo em Portugal, resultados do Censo Nacional 2002/2003. Relatório Técnico Instituto da Conservação da Natureza/Grupo Lobo. Lisboa, 3-12.
- Poli, A., Arispici, M., Mancianti, F., Abramo, F. (1991). Pathology of naturally acquired *Angiostrongylus vasorum* infection in the red fox (*Vulpes vulpes*). *Angew Parasitol* 32(3):121-6.
- Pozio, E., Hoberg, E., Rosa, G.L., Zarlenga, D.S. (2009). Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infection, Genetics and Evolution* 9, pp 606-616.
- Pozio, E., Rinaldi, L., Marucci, G., Musella, V., Galati, F., Cringoli, G., Boireau, P., La Rosa, G. (2009). Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. *International Journal for Parasitology* 39 : pp 71–79.
- PROCICCHIANI, I. (2005) – How to do a Parasitological Examination of Faeces. *Società Italiana Veterinari per Equini - SIVE - 11° Congresso Nazionale Multisala, Pisa, Publicado em www.ivis.org* , 3 pp.
- REGULAMENTO (CE) N.º 2075/2005 DA COMISSÃO de 5 de Dezembro de 2005 que estabelece regras específicas para os controlos oficiais de detecção de triquinias na carne (Texto relevante para efeitos do EEE). (2005). *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Rochette, F. (2003). Los parásitos del perro y su control. Veterinária esteve, Barcelona, Espanha. *Toxocara canis* – p275 276
- Saeed, I., Maddox-Hyttel, C., Monrad, J., Kapel, C.M.O.. (2006). Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Vet Parasitol* 139(1-3):168-79.
- Segovia, J.M., Torres, J., Miquel, J., Llana, L., & Feliu, C. (2001). Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from the north-western Spain. *J. Helminthology*, 75: 183-192.
- Simpson, V.R. (1996). *Angiostrongylus vasorum* infection in foxes (*Vulpes vulpes*) in Cornwall. *Vet. Record* 139 (18): 443-445.
- Sréter, T., Széll, Z., Marucci, G., Pozio, E., Varga, I. (2003). Extraintestinal nematode infections of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary. *Vet Parasitol* 115(4):329-34

- Queiroz, A., Alves, P.C., Barroso, I., Beja, P., Fernandes, M., Freitas, L., Mathias, M.L., Mira, A., Palmeirim, J.M., Prieto, R., Rainho, A., Rodrigues, L., Santos-Reis, M., Sequeira, M. (2006). *Canis lupus Lobo* Pp 517-518. In Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Cabral, M.J., Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queiroz, A., Rogado, L., Santos-Reis, M.). 2ª ed. Instituto da Conservação da Natureza/Assírio & Alvim. Lisboa. (pp. 8-35).
- Sréter, T., Széll, Z., Marucci, G., Pozio, E., Varga, I. (2003). Extraintestinal nematode infections of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary. *Veterinary Parasitology*, 115 (2003) 329-334.
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J. (1986) - Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. 2ª Ed, Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica: 109-129.
- Thompson, R.C.A. (2004). *The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis*. *Vet. Parasitol.* 126, 15–35.
- Thompson, R.C.A., Monis, P.T. (2004). Variation in *Giardia*: Implications for Taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.* 58, 69–137.
- Torres, J., Segovia, J.M., Miquel, J., Feliu, C., Llana, L., Petrucci-Fonseca, F. (2000). Helmintofauna del lobo ibérico (*Canis lupus signatus* CABRERA, 1907). Aspectos potencialmente útiles en mastozoología. *Galemys* 12 (nº especial). 1-11.
- Torres, J., Pérez, M.J., Segovia, J.M., Miquel, J. (2001). Utilidad de la coprología parasitaria en la detección de helmintos parásitos en los cánidos silvestres ibéricos. *Galemys* 13 (nº especial): 75-83.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M., e Jennings, F. W. (1996). *Parasitología Veterinaria*. 2ª Ed.: 25-117.
- Vasconcellos, M. C., Barros, J.S.L., Oliveira, C.S. (2006). Parasitas gastrointestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro, RJ. *Rev Saúde Pública*, 40(2): 321-323.
- Veterinary Parasitology VPTH603 Laboratory - <http://cal.vet.upenn.edu/paraav/>
- William M. Samuel, W.S., Pybus, M. J., Kocan, A. A. (2001). *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press / Ames. 2nd edition: 193-227; 416-459.
- Zar, J.H. (1996). *Biostatistical analysis*. Third Edition. London, Prentice-Hall International, Inc.

# **ANEXOS**





