



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Contributo para o estudo da caracterização
genética de estirpes portuguesas de
*Echinococcus granulosus***

Sílvia Filipa Alves Beato Salvador

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ESPECIALIDADE DE PARASITOLOGIA

ABRIL, 2016



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Contributo para o estudo da caracterização genética
de estirpes portuguesas de *Echinococcus granulosus***

Sílvia Filipa Alves Beato Salvador

Licenciada em Análises Clínicas e de Saúde Pública

Mestre em Ciências Biomédicas

Orientadora: Professora Doutora Maria Amélia Afonso Grácio

Co-orientador: Professor Doutor Ricardo Manuel Parreira

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Especialidade de Parasitologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Amélia Grácio e co-orientação científica do Professor Doutor Ricardo Parreira. Apoio financeiro de Bolsa de doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia SFRH/BD/60408/2009.

ABRIL, 2016

Publicações

Beato, S., Parreira, R., Roque, C., Gonçalves, M., Silva, L., Maurelli, M.P., Cringoli, G., Grácio, M.A. (2013). ***Echinococcus granulosus* in Portugal: The first report of the G7 genotype in cattle.** Veterinary Parasitology, 198 (1-2), 235-239.

Beato, S., Parreira, R., Calado, M.C., Grácio, M.A. (2010). **Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal.** Parasitology International, 59(4):638-42.

Aos meus pais que tudo tornaram possível

Agradecimentos

Durante os últimos cinco anos novos objectivos me foram propostos e que muito importantes têm sido na minha formação científica e profissional, pois tive o privilégio de me cruzar com pessoas extraordinárias que permitiram que eu pudesse realizar este projecto até ao final. A todas elas o meu sincero agradecimento:

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro dado pela Bolsa de doutoramento SFRH/BD/60408/2009

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Amélia Grácio pelo conhecimento partilhado comigo ao longo da realização deste trabalho;

Ao meu co-orientador Professor Doutor Ricardo Parreira pelos ensinamentos durante horas e dias, pela paciência e disponibilidade que sempre teve nos últimos anos;

À Professora Doutora Maria Manuela Calado por ter feito parte da minha Comissão Tutorial para o doutoramento;

A todos os elementos da Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas pelo acolhimento que demonstraram fazendo-me sentir em casa;

Ao Doutor Pedro Ferreira pela amizade e disponibilidade que sempre teve para me ajudar quando era necessário;

Aos serviços veterinários de todos os matadouros com que trabalhei pela disponibilidade para a recolha das amostras necessárias para a realização do estudo;

À Professora Doutora Paula Sapeta, na qualidade de directora da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, pela disponibilização das infraestruturas da instituição para poder desenvolver alguns dos trabalhos práticos e a todos os funcionários da referida Escola pela disponibilidade e paciência que demonstraram e pelo apoio que me deram.

Ao Professor Doutor Francisco Rodrigues por me ter apoiado e ajudado sempre que necessário de forma a cumprir as minhas tarefas profissionais.

Ao Cláudio Roque pela amizade, pelos momentos de trabalho laboratorial sempre com boa disposição, fazendo com que cada dia fosse agradável e pela ajuda em todos os momentos mais difíceis e trabalhosos, tornando possível a realização de diversas tarefas.

Aos meus tutores da Unidade Local de Saúde de Matosinhos, Dra. Manuela Mendes, Dra. Ana Sardinha, Dra. Sofia Aroso e Dr. Silva Mendes pela possibilidade de poder fazer o meu estágio e finalizar o trabalho, ajudando-me sempre que necessário.

A todos os meus amigos e colegas que de alguma forma me ajudaram com conselhos e amizade e muitas vezes tiveram de aturar o meu mau feitio.

Aos meus pais por me terem dado os valores e a educação necessários, sempre estarem quando é necessário para me ouvir e aconselhar e pelo que representam para mim.

Ao meu querido marido Rúben, pelo amor e carinho, por sempre estar ao meu lado a apoiar-me, animar-me a continuar quando as forças me faltavam e por me ter ajudado em tudo e a todas as horas.

A todos aqueles que de forma directa ou indirecta me deram apoio e força para continuar a lutar pelos meus sonhos, sabendo que o fim das coisas tem sempre um sabor melhor quando temos os amigos verdadeiros ao nosso lado.

E por fim, mas sendo o mais importante, a Deus que sem Ele não seria possível chegar a este ponto, pois se não me guardasse nas muitas viagens que fiz nestes anos e não me desse inteligência e discernimento para levar a bom termo este trabalho, fisicamente teria desistido.

Abstract

Cystic echinococcosis is a zoonosis caused by the tapeworm *Echinococcus granulosus*, with its specie variabilities known as genotypes, characterized in 11 different genotypes. Some of these became new species and others were rearranged in complex cryptic species. The lifecycle of the parasite is mainly domestic, requiring dogs as definitive hosts and livestock species as intermediate hosts. Humans are considered accidental hosts. Although cystic echinococcosis is a public health problem in Portugal, the rare data available concerns only infection in intermediate hosts. The aim of this work is to do a genetic characterization of *Echinococcus* samples in Portugal and evaluate its phylogenetic relationships worldwide.

A slaughterhouse survey was conducted to assess prevalence and perform the molecular characterization of *E. granulosus* in sheep, cattle, goats and human samples. For the survey 211 samples were obtained, namely 175 from sheep, 3 from goats, 32 from cattle and 1 human. Also were used 3 samples form Italian buffalos and 2 samples from Brazilian sheep

Molecular analyses based on mitochondrial genes identified genotypes G1-G3 of *E. granulosus sensu stricto* in almost all livers, pancreas, kidneys and lung samples. One sample was identified as G7 genotype of *E. canadensis*. Based on the concatenated sequences of *cox1+ATP6+rrnL+rrnS* (~2600 bp), the phylogenetic trees have shown the probability of segregation, showing that three portuguese samples were segregated with G3 genotype of *E. granulosus sensu stricto*. The high (30,0%) cyst fertility observed in sheep argues for the potential contribution of sheep to the lifecycle of *E. granulosus sensu stricto*, like previous observations in Europe. The 71 Portuguese samples identified as G1-G3 genotypes are dispersed in the center and south of Portugal and are the dominant genetic cluster in pastoral and livestock animals. The identification of a cattle sample as G7 genotype of *E. canadensis* alerts us to the transmission of the G7 genotype to cattle. This is a new finding not known until now.

The nuclear genes analysis sowed similar phylogenetic trees revealing a sample segregated with *E. canadensis* complex and the other samples segregated with the *E. granulosus s.s.* genotypes G1-G3.

The souththern part of Portugal, considered having a hyperendemic situation, still has a high number of slaughtered animals at home, usually without veterinary inspection. Further extensive slaughterhouse surveys with molecular identification also involving other slaughterhouses, are essential to obtain a better overview of the epidemiological situation of *E. granulosus sensu lato* in the country. In addition, human studies are relevant to better improve public health programs and treatments.

Keywords: *Echinococcus granulosus*; Portugal; G1-G3 genotypes; Sheep; Cattle.

Resumo

A hidatidose/equinococose é uma zoonose causada pelo céstode *Echinococcus granulosus*, juntamente com as suas variantes específicas denominadas de genótipos. Estão descritos 11 genótipos diferentes sendo que alguns destes já obtiveram o estatuto de novas espécies de *Echinococcus* e outras foram rearranjadas em complexos crípticos de espécies. O ciclo de vida do parasita é maioritariamente doméstico, tendo canídeos como hospedeiros definitivos e pequenos ruminantes e gado bovino como hospedeiros intermediários. O Homem é considerado um hospedeiro accidental. Embora a hidatidose/equinococose seja um problema de Saúde Pública em Portugal, existem poucos dados epidemiológicos sobre a infecção por este parasita e esses são apenas referentes a alguns hospedeiros intermediários. O principal objectivo deste trabalho é caracterizar geneticamente as amostras de *Echinococcus* obtidas em Portugal e estudar as relações filogenéticas destas com as amostras descritas em todo o mundo.

Foram obtidas 211 amostras provenientes de matadouros portugueses, sendo 175 de ovinos, 3 de caprinos e 32 de bovinos. Foi ainda obtida uma amostra de um humano. Foram ainda utilizadas neste estudo três amostras provenientes de búfalos de Itália e duas amostras provenientes de ovinos do Brasil. Com as amostras férteis (n=72) foi feita a caracterização molecular para fragmentos de genes mitocondriais.

A análise molecular das amostras de fígado, rim, pâncreas e pulmão, identificou a maior parte como pertencendo ao complexo G1-G3 de *E. granulosus sensu stricto*. Uma amostra foi identificada como *E. canadensis* genótipo G7. Com base nas sequências concatenadas dos genes *cox1+ATP6+rrnL+rrnS* (~2600pb) foi efectuada inferência filogenética a qual demonstrou probabilidade de segregação de três amostras portuguesas juntamente com sequências de referência do genótipo G3 do *E. granulosus s.s.* Foi observada uma elevada fertilidade (~30%) nos quistos hidáticos provenientes de ovinos, tendo um elevado potencial infeccioso para os diversos hospedeiros intermediários, informação que está de acordo com o observado com outros estudos realizados na Europa.

As 71 amostras portuguesas identificadas como pertencentes ao complexo de genótipos G1-G3 estão dispersas no Centro e Sul de Portugal, sendo este o complexo genético mais comumente encontrado nos animais de pastorícia e no gado bovino. Foi identificada uma amostra de bovino como pertencendo ao genótipo G7 do complexo *E. canadensis* que pode ser um alerta para a possibilidade de transmissão deste genótipo entre o gado bovino, facto que ainda não tinha sido descrito até à actualidade.

Foi também efectuada análise filogenética com base em dois fragmentos de genes nucleares que revelaram resultados semelhantes aos obtidos com a análise efectuada com os fragmentos de genes mitocondriais, revelando a presença de uma amostra que segregava juntamente com o complexo *E. canadensis* e todas as outras amostras encontravam-se dentro do complexo *E. granulosus s.s.* genótipos G1-G3.

A zona sul de Portugal (Alentejo), considerada como hiperendémica, continua a ter bastantes situações de abate de animais a nível doméstico, normalmente sem controlo veterinário.

Assim a existência de mais estudos epidemiológicos e moleculares envolvendo outros matadouros, com maior abrangência a nível nacional e contemplando outros possíveis hospedeiros, permitiria evidenciar a situação epidemiológica do *E. granulosus s.s.* no país. Também seria importante a existência de estudos em amostras humanas para uma melhor implementação dos programas de Saúde Pública e para uma opção mais eficaz na escolha de tratamentos para a parasitose.

Palavras-chave: *Echinococcus granulosus*; Portugal; Genótipos G1-G3; Ovinos; Bovinos.

Índice geral

Publicações	iii
Agradecimentos	vii
Abstract	ix
Resumo	xi
Índice geral	xiii
Índice de tabelas	xv
Índice de figuras	xvii
Abreviaturas	xix
<i>INTRODUÇÃO GERAL</i>	<i>1</i>
<i>CAPÍTULO 1 Revisão teórica</i>	<i>3</i>
1.1. Sistemática	8
1.2. Ciclo de vida	12
1.3. Epidemiologia	16
1.3.1. Epidemiologia molecular	18
1.4. Marcadores moleculares	24
1.5. Patologia e resposta imune	27
1.6. Diagnóstico	29
1.6.1. Diagnóstico nos hospedeiros definitivos	29
1.6.2. Diagnóstico nos hospedeiros intermediários	32
1.7. Tratamento	33
1.8. Medidas de controlo	36
1.9. Objectivos	38
1.9.1. Objectivos específicos	38
1.10. Referências bibliográficas	39
<i>RESULTADOS</i>	<i>59</i>
<i>CAPÍTULO 2 Epidemiologia do quisto hidático e sua fertilidade em Portugal</i>	<i>61</i>
2.1. Introdução	63
2.2. Materiais e métodos	64
2.2.1. Recolha das amostras	65
2.2.2. Trabalho laboratorial	65
2.2.3. Trabalho estatístico	65
2.3. Resultados	66
2.3.1. Distribuição geográfica das amostras obtidas	71

2.4. Discussão	72
2.5. Referências bibliográficas	76
<i>CAPÍTULO 3 Comparação da eficiência de cinco métodos de extracção de DNA de Echinococcus granulosus a partir de amostras biológicas</i>	79
Resumo	81
Comparative performance of five diferente methods for the extraction of <i>Echinococcus granulosus</i> DNA from biological samples (artigo publicado)	83
<i>CAPÍTULO 4 Dominância aparente do complexo genético G1-G3 de Echinococcus granulosus na região centro de Portugal</i>	105
Resumo	107
Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of <i>Echinococcus granulosus</i> strains in the central inland region of Portugal (artigo publicado)	109
<i>CAPÍTULO 5 Echinococcus granulosus em Portugal: primeira evidência do genótipo G7 em gado bovino</i>	115
Resumo	117
<i>Echinococcus granulosus</i> in Portugal: The first report of the G7 genotype in cattle (artigo publicado)	119
<i>CAPÍTULO 6 Avaliação das relações filogenéticas existentes entre os genótipos de Echinococcus circulantes em Portugal</i>	125
6.1. Introdução	127
6.2. Materiais e métodos	130
6.3. Resultados	133
6.3.1. Análise filogenética dos marcadores mitocondriais	133
6.3.2. Análise filogenética dos marcadores nucleares	144
6.4. DISCUSSÃO	149
6.5. Referências bibliográficas	155
<i>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES</i>	161
Referências bibliográficas	172

Índice de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1 – Taxonomia do género <i>Echinococcus</i> e algumas características das diferentes espécies _____	11
---	-----------

Capítulo 2

Tabela 1 – Distribuição das amostras consoante a espécie e o órgão _____	66
Tabela 2 – Distribuição das amostras consoante a espécie, o órgão e a quantidade de quistos férteis _____	67
Tabela 3 – Distribuição das amostras férteis, inférteis e calcificadas, por espécie _____	68
Tabela 4 – Associação entre a fertilidade dos quistos e a variável hospedeiro animal _____	69
Tabela 5 – Distribuição dos quistos férteis, inférteis e calcificados, por órgão parasitado _____	69
Tabela 6 – Associação entre a fertilidade dos quistos e a variável órgão _____	70
Tabela 7 – Distribuição geográfica das amostras recolhidas entre 2007 e 2011 _____	71

Capítulo 3

Table 1 – Statistical analysis of DNA concentration as a function of the extraction method used _____	101
Table 2 – Statistical analysis of purity (A260/230 ratio) as a function of the extraction method used _____	102
Table 3 – Statistical analysis of purity (A260/280 ratio) as a function of the extraction method used _____	103

Capítulo 6

Tabela 1 – Sequências de <i>primers</i> desenhados para o estudo de fragmentos de genes mitocondriais. _____	131
Tabela 2 – Característica das amostras trabalhadas por hospedeiro, localização do quisto e genótipo _____	133

Tabela 3 – Distribuição dos genótipos das amostras estudadas após análise dos aminoácidos codificados pela porção analisada da sequência do gene mitocondrial COI _____	141
Tabela 4 – Distribuição dos genótipos das amostras estudadas tal como definido pela análise da sequência primária dos produtos aparentemente codificados pela secção analisada do gene COI _____	141
Tabela 5 – Distribuição dos genótipos das amostras estudadas após análise dos aminoácidos codificados pela porção analisada da sequência do gene mitocondrial ATP6 _____	143

Índice de figuras

Capítulo 1

- Figura 1** – Protoescólicas em quisto hidático de fígado de ovino _____ 12
Figura 2 – Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* _____ 14

Capítulo 2

- Figura 1** – Pulmão de ovino evidenciando um quisto hidático calcificado _____ 68
Figura 2 – Distribuição geográfica, por distrito, das amostras de *Echinococcus granulosus* recolhidas entre 2007 e 2011 _____ 71

Capítulo 3

- Figure 1** Comparison of PCR-amplified partial COI mitochondrial fragments from *Echinococcus sp.* With JB3 and JB4.5 primers. (A – QIAamp DNA mini kit; B – High Pure PCR template preparation kit; C – Modified version of phenol-chloroform extraction method) _____ 104
Figure 2 – Comparison of PCR-amplified partial COI mitochondrial fragments from *Echinococcus sp.* With JB3 and JB4.5 primers. (D – Ron’s Tissue DNA Mini kit; E – Wizard Genomic DNA Purification kit) _____ 104

Capítulo 4

- Figure 1** – Map of Portugal showing the geographic origin and number of the *Echinococcus granulosus* strains analyzed _____ 110
Figure 2 – Phylogenetic tree (Bayesian analysis) generated from the analysis of partial *Echinococcus cox1* sequences _____ 111
Figure 3 – Bayesian phylogenetic tree of partial mitochondrial *Echinococcus* ATP6 and *cox1/rnS/rnL* concatenated sequences _____ 112

Capítulo 5

- Figure 1** – Geographic origin, total number, and number of fertile samples (in brackets) of the *Echinococcus granulosus* strains analyzed in this study. District capitals are indicated _____ 120
Figure 2 – Phylogenetic tree (Bayesian analysis) generated from the analysis of partial *Echinococcus* COI coding sequences _____ 122

Capítulo 6

- Figura 1** – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene ribossomal 12S de *Echinococcus sp.* _____ **134**
- Figura 2** – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene mitocondrial COI de *Echinococcus sp.* _____ **136**
- Figura 3** – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene ribossomal 16S de *Echinococcus sp.* _____ **138**
- Figura 4** – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene mitocondrial ATP6 de *Echinococcus sp.* _____ **139**
- Figura 5** – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais concatenadas dos genes COI/ATP6/12S/16S (~2600 pb) de *Echinococcus sp.* _____ **140**
- Figura 6** – Distribuição, em percentagem, dos genótipos de *Echinococcus* obtidos pela análise dos codões do fragmento do gene mitocondrial COI no universo das amostras obtidas _____ **144**
- Figura 7** – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene nuclear EF1a de *Echinococcus sp.* _____ **146**
- Figura 8** – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene nuclear ELP, de *Echinococcus sp.* _____ **148**

Abreviaturas

%	Porcentagem
°C	Graus celsius
Act II	Actina II
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Aspargina
Asp	Aspartato
ATP6	ATP sintase F0 subunidade 6
BLASTn	Sítio de pesquisa de alinhamento de nucleótidos, do inglês “Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)”
Cal	Calreticulina
COI / cox1 / CO1	Citocromo c oxidase subunidade I
Cys	Cisteína
Cyt B	Citocromo b
D.f.	Graus de liberdade, do inglês “Degree of freedom”
DDBJ	Banco de dados de DNA do Japão, do inglês “DNA Data Bank of Japan”
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”
EF1a	Factor de alongação 1 alfa, do inglês “Elongation factor 1 alpha”
Eg95	Proteína altamente imunogénica 95, do inglês “Highly immunogenic protein 95”
ELISA	do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
ELP	do inglês “Esrin-radixin-moesin like protein”
EMBL	Laboratório europeu de biologia molecular, do inglês “European Molecular Biology Laboratory”
ERM	Esrina-radixina-moesina
et al.	E outros, da locução latina <i>et alii</i>
G	Distribuição gama
GTR model	do inglês “Generalized time-reversible model”

Gly	Glicina
H₀	Hipótese nula
H₁	Hipótese alternativa
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgE	Imunoglobulina do tipo E
IgG	Imunoglobulina do tipo G
Ile	Isoleucina
IST	Técnica de captura intestinal, do inglês “Intestinal scraping technique”
ITS1	Espaçadores internos transcritos, do inglês “Internal transcribed spacer 1”
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MAFFT	Alinhamento múltiplo utilizando transformações rápidas de Fourier, do inglês “Multiple Alignment using Fast Fourier Transform”
Mdh	Malato desidrogenase
Met	Metionina
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido
NDI / nad1 / ND1	Nad-desidrogenase subunidade 1
nm	Nanómetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Probabilidade
PAIR	Punção, aspiração, injeção, re-aspiração
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate-Buffer Saline”
PCR	Reacção em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase chain reaction”
Phe	Fenilalanina
RFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição, do inglês “Restriction fragment length polymorphism”

RAPD	Amplificação de polimorfismos de distribuição aleatória, do inglês “Random Amplified Polymorphic DNA”
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
rRNA	Ácido ribonucleico, do inglês “Ribosomal ribonucleic acid”
rrnL/16S	Grande subunidade ribossomal do ácido ribonucleico, do inglês “Large subunit ribosomal RNA”
rrnS/12S	Pequena subunidade ribossomal do ácido ribonucleico, do inglês “Small subunit ribosomal RNA”
Ser	Serina
SCT	Técnica de sedimentação e contagem, do inglês “Sedimentation and Counting Technique”
sp.	Espécie
spp.	Espécies
SPSS	do inglês “Statistical Package for the Social Science”
SSCT	Sedimentação Segmentar e Técnica de Contagem
Thr	Tirosina
tRNAs	Ácido ribonucleico de transferência
Val	Valina
Vs.	do latim <i>versus</i>
π	Índice de diversidade nucleotídica
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micramolar
χ^2	Qui-quadrado

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO 1

Revisão teórica

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

Echinococcus granulosus Batsch, 1786, Rudolphi, 1801, helminta da família Taeniidae, é o agente etiológico da hidatidose/equinococose, doença crónica negligenciada, e com uma distribuição cosmopolita (Piccoli *et al.*, 2013, Brunetti, Garcia e Junghanss, 2011). No seu ciclo, o cão e outros canídeos como o lobo ou a raposa, assumem o papel de hospedeiros definitivos, enquanto os animais para consumo humano (principalmente ovinos e bovinos) são os hospedeiros intermediários (Craig *et al.*, 2007). Os humanos são um hospedeiro intermediário acidental quando ocorre a ingestão de ovos do parasita. O parasita pode surgir em quase todos os órgãos e cavidades vascularizadas (maioritariamente no fígado e pulmão), desenvolvendo-se e formando quistos (metacéstodes) (Larrieu e Frider, 2001). A infecção no hospedeiro intermediário, que pode ser assintomática durante alguns anos, apresenta um quadro clínico quando o quisto hidático se desenvolve e exerce compressão nos órgãos/tecidos do hospedeiro ou após a ruptura do quisto, levando a uma reacção anafilática bastante exuberante. O diagnóstico da hidatidose é feito muitas vezes por exclusão de diagnósticos sendo normalmente usadas técnicas imagiológicas nomeadamente ecografia e técnicas de serologia (Brunetti *et al.*, 2011, Brunetti e Junghanss, 2009).

A caracterização genética do agente da hidatidose humana ou animal é um instrumento útil para a confirmação do diagnóstico e para a possibilidade de se conhecerem os padrões de distribuição, transmissão e suscetibilidade de um hospedeiro intermediário para determinado genótipo de *E. granulosus*. Até recentemente, a taxonomia de *Echinococcus spp.* tem sido um assunto controverso devido à diversidade morfológica, tanto no parasita adulto como no seu estadio larvar (Nakao *et al.*, 2013). O desenvolvimento incompleto dos metacéstodes em hospedeiros considerados aberrantes tem servido para criar uma maior confusão nos estudos efectuados, pois tem levado ao aparecimento de novas estirpes/genótipos, o que por si só torna difícil o agrupamento dentro das espécies já descritas. A espécie *E. granulosus* Batsch, 1786, Rudolphi, 1801, foi historicamente considerada como a causa de hidatidose unilocular e alveolar até final dos anos 50 do século passado (Vuitton *et al.*, 2011). Algum tempo mais tarde, a espécie *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863 foi finalmente confirmada e o seu ciclo de vida foi descrito (Nakao *et al.*, 2013). Porém, a taxonomia do *E. granulosus* manteve-se

CAPÍTULO 1

controversa porque continuaram a ser encontradas hidátides uniloculares morfologicamente indistinguíveis em diversos ungulados e humanos. Assim, foram propostas várias subespécies de *E. granulosus* baseadas maioritariamente na especificidade do hospedeiro intermediário. Contudo, os taxa sub-específicos propostos foram relegados para sinónimos de *E. granulosus* devido à sua aparente distribuição simpátrica com as subespécies referidas. Foram feitas tentativas de comparação morfológica tradicional baseada na observação microscópica dos metacéstodes obtidos de hospedeiros intermediários, mas não foi possível distinguir as subespécies umas das outras e da espécie *E. granulosus*. Consequentemente, apenas quatro espécies morfológicas, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthra* (Nakao *et al.*, 2013, Hüttner e Romig, 2009, Cameron, 1926, Diesing, 1863) e *E. vogeli* Rausch e Bernstein, 1972, permaneceram como válidas (Eckert *et al.*, 2001). A referida espécie *E. granulosus* foi sub-dividida em estirpes de forma a delinear a especificidade para o hospedeiro intermediário onde tinham sido primariamente descritas: “estirpe da ovelha, do búfalo, do cavalo, do gado, do porco, do camelo e dos cervídeos” e, foi ainda definida uma estirpe, com base no seu hospedeiro definitivo, a “estirpe do leão” (Eckert *et al.*, 2001, Thompson *et al.*, 1995, Kumaratilake e Thompson, 1982). Assim, no final do século passado, com base em estudos moleculares efetuados, foi possível alterar a taxonomia de *Echinococcus spp.* (Bowles e McManus, 1993, Bowles *et al.*, 1992), tendo sido demonstrado que *E. multilocularis*, *E. vogeli* e *E. oligarthrus* eram distintas umas das outras e que *E. granulosus* poderia ser dividida em genótipos: G1 a G8. Estes genótipos tinham correspondência com algumas das estirpes referidas anteriormente como: G1 (estirpe da ovelha), G2 (estirpe da ovelha da Tasmânia), G3 (estirpe do búfalo), G4 (estirpe do cavalo), G5 (estirpe do gado), G6 (estirpe do camelo), G7 (estirpe do porco) e G8 (estirpe dos cervídeos). Actualmente ainda são utilizadas estas denominações como padrões para a classificação molecular quando se realizam estudos de epidemiologia molecular em hidatidose (McManus e Thompson, 2003). Foram caracterizados ainda mais dois genótipos denominados de G9 (sem estirpe definida) e de G10 (estirpe dos cervídeos feno-escandinavos) (Lavikainen *et al.*, 2003, Scott *et al.*, 1997). Assim, embora continue o debate científico sobre a taxonomia, foram descritos até à atualidade 11 genótipos ou estirpes distintas de *E. granulosus* (G1-G10) e o genótipo

CAPÍTULO 1

do leão (*E. felidis*), consoante o hospedeiro intermediário mais comum (McManus e Thompson, 2003, Thompson e McManus, 2002, Bowles, Blair e McManus, 1994).

Nos últimos anos os estudos com base nas análises filogenéticas usando genoma mitocondrial e nuclear, mostraram que estes genótipos eram parafiléticos, sugerindo que *E. granulosus* é um conjunto críptico de espécies carecendo ainda de uma melhor clarificação, dada a sua diversidade (Nakao *et al.*, 2013). Dados obtidos a partir da sequenciação dos genomas mitocondriais dos genótipos G1 e G4 (Le *et al.*, 2002) e *E. multilocularis* (Nakao *et al.*, 2002), mostraram a existência de divergência genética, tendo levado novamente à revisão taxonómica dos genótipos de *E. granulosus*. Após estes estudos, a primeira revisão taxonómica elevou a espécie o *Echinococcus equinus* Williams e Sweatman, 1963, e trouxe de novo à discussão o *Echinococcus ortleppi* López-Neyra e Soler Planas, 1943, com base em dados ecológicos, morfológicos e genéticos (Thompson e McManus, 2002). Houve uma segunda revisão taxonómica que também se baseou na análise filogenética do genoma mitocondrial e que elevou a espécie o *Echinococcus granulosus canadensis* Webster e Cameron, 1961 (Nakao *et al.*, 2007). Com estas alterações os genótipos de *E. granulosus* ficaram distribuídos da seguinte forma: *E. granulosus* sp. (G1, G2, G3 ou cluster G1-G3 e *E. felidis*), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5) e *E. canadensis* (G6, G7, G8, G9 e G10 ou complexo G6-G10) (Knapp *et al.*, 2011, Saarma *et al.*, 2009, Thompson, 2008, Nakao *et al.*, 2007, Romig, Dinkel e Mackenstedt, 2006). Em 2005 foi descrita, na China, a espécie *Echinococcus shiquicus* Xiao, Qiu, Nakao, Li, Yang, Chen, Schantz, Craig e Ito, 2005, presente na região do planalto tibetano (Xiao *et al.*, 2006, 2005) e foi confirmada a validade da espécie *E. felidis* Ortlepp, 1937 (Hüttner *et al.*, 2008). O reconhecimento taxonómico de espécies foi confirmado por análise de sequências genómicas.

A recentemente agrupada espécie *E. granulosus* sp. inclui os genótipos G1 (estirpe da ovelha comum), G2 (estirpe da ovelha da Tasmânia) e G3 (estirpe do búfalo) e tem sido encontrada mais frequentemente a infectar os humanos do que outras espécies do género *Echinococcus*. Em relação à estirpe do cavalo (G4) ou *E. equinus*, parece não haver casos de infecciosidade para os humanos e existem muito poucos casos relatados de infeções humanas pela estirpe dos bovinos (G5) ou *E. ortleppi* (de la Rue *et al.*, 2011, Romig *et al.*, 2006, Bowles, van Knapen e

CAPÍTULO 1

McManus, 1992). No que concerne ao complexo G6-G10 existe alguma controvérsia, tendo nos últimos tempos havido uma considerável investigação para esclarecer as relações infecciosidade e transmissão deste mesmo complexo. No que diz respeito aos humanos, as estirpes do camelo (G6), a do porco (G7) e a G9, além de estarem geneticamente relacionadas entre si, tal como as estirpes dos cervídeos (G8 e G10), também parecem apresentar um grau de infecciosidade moderado (Knapp *et al.*, 2011; Simsek, Kaplan e Ozercan, 2011, Schneider *et al.*, 2010; Nakao *et al.*, 2007). Contudo, estes dados encontram-se em constante avaliação e vão surgindo novas informações sobre a infecciosidade destas estirpes para os humanos.

Tendo em conta a importância que esta parasitose ainda tem em Portugal, quer devido à infecciosidade para com os hospedeiros intermediários (pequeno ruminantes, bovinos e porcinos), quer para os humanos (como hospedeiros acidentais), que continuam a ser infetados devido sobretudo à atividade de pastorícia a que parte da população de algumas regiões geográficas se dedica, reveste-se de elevada importância o conhecimento molecular das estirpes/genótipos circulantes para um melhor estabelecimento de planos de prevenção e combate a esta parasitose.

1.1. Sistemática

Equinococose é um termo utilizado para descrever a patologia parasitária e zoonótica causada pelos estadios adulto ou larvar (metacéstode) das espécies dos céstodes, pertencentes ao género *Echinococcus* (Rudolphi, 1801), pertencentes à família Taeniidae (Ludwig, 1886), dentro da ordem Cyclophyllidea (Schmidt, 1982), subclasse Eucestoda (Southwell, 1930), classe Cestoda e filo Platyhelminthes. Rudolphi (1801) denominou o género de *Echinococcus* no qual o nome para o parasita *Echinococcus granulosus* tem sido adoptado. Ao longo dos anos houve diversas revisões taxonómicas ao género *Echinococcus*, sendo que as primeiras foram baseadas em observações morfológicas e biológicas de infecções naturais e experimentais (Kumaratilake e Thompson, 1982). Rausch e Nelson (1963) fizeram uma revisão em que simplificaram e agruparam as diversas espécies componentes deste género *Echinococcus*, do seguinte modo:

CAPÍTULO 1

Família Taeniidae Ludwig, 1886

Género *Echinococcus* Rudolphi, 1801

E. granulosus Batsch, 1786

E. multilocularis Leuckhart, 1863

E. oligarthra Diesing, 1863

E. vogeli Rausch e Bernstein, 1972

Contudo, nos últimos anos ainda foram consideradas mais cinco espécies válidas (*E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. shiquicus* e *E. felidis*) (Hüttner *et al.*, 2008, Nakao *et al.*, 2007). A identificação da espécie como *E. granulosus* advém de descrições iniciais de quistos hidáticos em ovinos (Batsch, 1786). Apesar das tentativas para a clarificação da taxonomia deste género, muitos investigadores concordam que a classificação e nomenclatura de *Echinococcus* tem sido controversa durante muito tempo (Thompson e Lymbery, 1988). As principais razões apontadas para esta controvérsia têm sido devidas ao facto de os parasitas pertencentes a este género terem um número de características fenotípicas muito pequeno, e porque as descrições taxonómicas existentes têm sido insuficientes (Nakao *et al.*, 2007). As espécies e sub-espécies de *Echinococcus* foram originalmente descritas baseando-se maioritariamente nas características da especificidade da relação parasita-hospedeiro (Thompson, 2008).

Alguns anos mais tarde alguns investigadores chegaram à conclusão de que a caracterização morfológica por si só não seria suficiente para a diferenciação das espécies de *Echinococcus*. Das onze espécies propostas apenas três poderiam ser distinguíveis morfológicamente, sendo seis semelhantes ao *E. granulosus* e o estatuto de outras duas permanecia indeterminado. Após várias tentativas de encontrar consenso acerca da especiação de *Echinococcus*, chegou-se à conclusão que havia espécies que ocupavam o mesmo espaço geográfico e tinham os mesmos hospedeiros definitivos que o *E. granulosus* (Le *et al.*, 2002) e que poderia influenciar os diferentes ciclos de vida (Thompson, 2008).

Vários investigadores chegaram à conclusão que seria necessária uma nomenclatura taxonómica formal de modo a haver uma comunicação científica

CAPÍTULO 1

efectiva a todos os níveis e que esta deveria providenciar estabilidade e valor preditivo acerca das características das diferentes espécies que compõem este género (Thompson e McManus, 2002). Isto também pode ser importante para se poderem construir medidas de vigilância e programas de controlo da hidatidose mais efectivos (Kumaratilake e Thompson, 1982). Assim, o conceito de “estirpe” foi aceite como referência a “variantes intra-específicas” das espécies conhecidas, mas em que o estatuto taxonómico pode não ser facilmente discernível (Thompson e Lymbery, 1988, Kumaratilake e Thompson, 1982). Actualmente, a classificação taxonómica aceite do género *Echinococcus* é a que se encontra na tabela 1.

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Taxonomia do género *Echinococcus* e algumas características das diferentes espécies

Espécies ^a	Classificação do genótipo ^a	Hospedeiros definitivos ^b	Hospedeiros intermediários ^b	Distribuição geográfica ^b
<i>E. granulosus</i> sensu stricto [*]	G1 - estirpe da ovelha	Cão, raposa, dingo (cão selvagem), chacal, hiena	Ovelha, gado bovino, porco, camelo, cabra, búfalo, macrópodos, javali, gato	Mundial
	G2 - estirpe da ovelha da Tasmânia	Cão, raposa	Ovelha, búfalo, gado bovino, camelo	Tasmânia, Argentina, Itália, Argélia
	G3 - estirpe do búfalo oriental	Cão, raposa	Ovelha, búfalo, gado bovino, camelo	Argentina, Brasil, Portugal, Itália, Grécia, Marrocos, Turquia, Irão, Índia
<i>E. equinus</i> (Williams e Sweatman, 1963)	G4 - estirpe do cavalo	Cão	Cavalo, burro	Europa
<i>E. ortleppi</i> [*] (López-Neyra e Soler Planas, 1943)	G5 - estirpe do gado bovino	Cão	Gado bovino, ovelha, cabra, búfalo, porco	Europa, Rússia, África do Sul, Índia, Nepal, Sri Lanka, América Central e do Sul
	G6 - estirpe do camelo	Cão	Camelo, ovelha, cabra, gado bovino, porco	África, Médio Oriente, Irão, China, Nepal, Argentina, Peru
<i>E. canadensis</i> [*] (Webster e Cameron, 1961)	G7 - estirpe do porco	Cão	Porco, javali, cabra, gado bovino	Espanha, Portugal, Austria, Europa de Leste e Sudeste, Turquia, Argentina, Peru
	G8 - estirpe dos cervídeos	Lobo, Cão	Alce, rena	América do Norte e Estónia
	G9 ¹	?	?	Polónia
	G10 ²	Lobo, cão, raposa?	Alce, rena	América do Norte, Finlândia, Suécia, Estónia
<i>E. felidis</i> (Ortlepp, 1937)	-	Leão, hiena?	Javali africano	Uganda
<i>E. multilocularis</i> [*] (Leuckart, 1863)	-	Raposa vermelha, raposa do ártico, cão, gato, lobo, guaximi, coiote	Roedores, porco doméstico e selvagem, cão, macaco, cavalo	América do Norte, Eurásia do Norte e Centro
<i>E. oligarthrus</i> ³ (Diesing, 1863)	-	Felídeos selvagens	Roedores	América Central e do Sul
<i>E. shiquicus</i> (Xiao et al., 2005)	-	Raposa tibetana	Pika Planalto	Planalto Tibetano (China)
<i>E. vogeli</i> [*] (Rausch e Bernstein, 1972)	-	Cão da pradaria, cão	Roedores	América Central e do Sul

^{*} Hospedeiros intermediários humanos

¹ Genótipo descrito apenas em humanos (Scott, Stafaniak, Pawlowski e McManus, 1997) ² Potencial zoonótico incerto (Romig, Dinkel e Mackenstedt, 2006) ³ Foram apenas confirmados 3 casos humanos (D'Alessandro e Rausch, 2008)

^a Adaptado com base em Thompson, 2008, Tappe et al., 2010, Knapp et al., 2011 e Nakao et al., 2013. ^b Dados obtidos a partir de Scott et al., 1997; Lavikainen et al., 2003; McManus e Thompson, 2003; Dinkel et al., 2004; Eckert e Deplazes, 2004; Mwambete, Ponce-Gordo e Cuesta-Bandera, 2004; Xiao et al., 2005; Lavikainen et al., 2006; Romig et al., 2006; Beato, 2009; D'Alessandro e Rausch (2008); Hüttner et al., 2008; Hüttner, Siefert, Mackenstedt e Romig, 2009; Omer et al., 2010; Kamal, Romig, Kern e Rihab, 2011; Konyaev et al., 2011; Rojo-Vazquez et al., 2011; Sharifiyazdi, Oryan, Ahmadnia e Valinezhad, 2011.

1.2. Ciclo de vida

Cães (*Canis familiaris*) e outros carnívoros são os hospedeiros definitivos habituais para o *E. granulosus*, enquanto os hospedeiros intermediários se inserem numa vasta lista de mamíferos, incluindo ungulados domésticos e também humanos (Torgerson e Budke, 2003). O hospedeiro intermediário aloja o metacéstode, que se irá desenvolver em quistos hidáticos férteis (que podem conter até milhares de protoescólices) ou inférteis. Os cães são infectados com quistos contendo protoscólices viáveis quando ingerem as vísceras parasitadas (figura 1) de um hospedeiro intermediário. Quando estas protoescólices são ingeridas por um hospedeiro definitivo susceptível, vão evaginar no duodeno após exposição à pepsina no estômago, biliar e aumento de temperatura (Thompson e McManus, 2002). Um parasita adulto sexualmente maduro pode-se desenvolver a partir de cada protoescólice (Thompson e McManus, 2002). Dependendo da espécie e da estirpe (genótipo) e da susceptibilidade do hospedeiro, o parasita adulto atinge a maturidade sexual cerca de quatro a seis semanas após infecção (Thompson e McManus, 2002), ficando alojado no íleon, de onde migrará de forma activa para as criptas de Lieberkühn e ligar-se-á à mucosa intestinal (Eckert *et al.*, 1989).



Figura 1 – Protoescólices em quisto hidático de fígado de ovino

Os parasitas adultos podem atingir cerca de 7mm em comprimento e são compostos por escólex com duas coroas de ganchos e quatro ventosas, a que se seguem 3 a 4 proglótides: colo ou pescoço, imatura, madura e grávida, dependendo

CAPÍTULO 1

da espécie ou estirpe (Roberts, 1994). O segmento terminal pode sair intato do intestino ou ser aí desintegrado, sendo as fezes responsáveis pela disseminação de proglótides e de ovos (Craig *et al.*, 2003).

O potencial biótico do *E. granulosus* é uma contribuição major para a dinâmica de transmissão deste parasita. O potencial biótico pode ser definido como “o número de potenciais quistos viáveis que se podem estabelecer num hospedeiro intermediário por um único hospedeiro definitivo, por dia” (Gemmell *et al.*, 2001). A média de parasitas no hospedeiro definitivo (cão) varia de forma considerável dentro das áreas consideradas endêmicas (Macpherson, 2001). Na maioria das zonas endêmicas em países desenvolvidos, a média de parasitas de *E. granulosus* no intestino do cão é entre 200-400 (Gemmell *et al.*, 1987). Contudo, em cães massivamente infestados, o número de parasitas adultos pode atingir os 50.000, ocupando completamente a extensão do intestino delgado (Macpherson *et al.*, 1983). Nas zonas mais húmidas do planeta, têm sido reportados casos de infestações massivas no hospedeiro definitivo, o que pode indicar que o potencial biótico varia amplamente perante diferentes situações ecológicas e condições climáticas (Macpherson, 2001). Foi sugerido que este tipo de ambiente ecológico pode aumentar o potencial biótico do parasita providenciando condições favoráveis para a sobrevivência dos ovos (Wachira *et al.*, 1991).

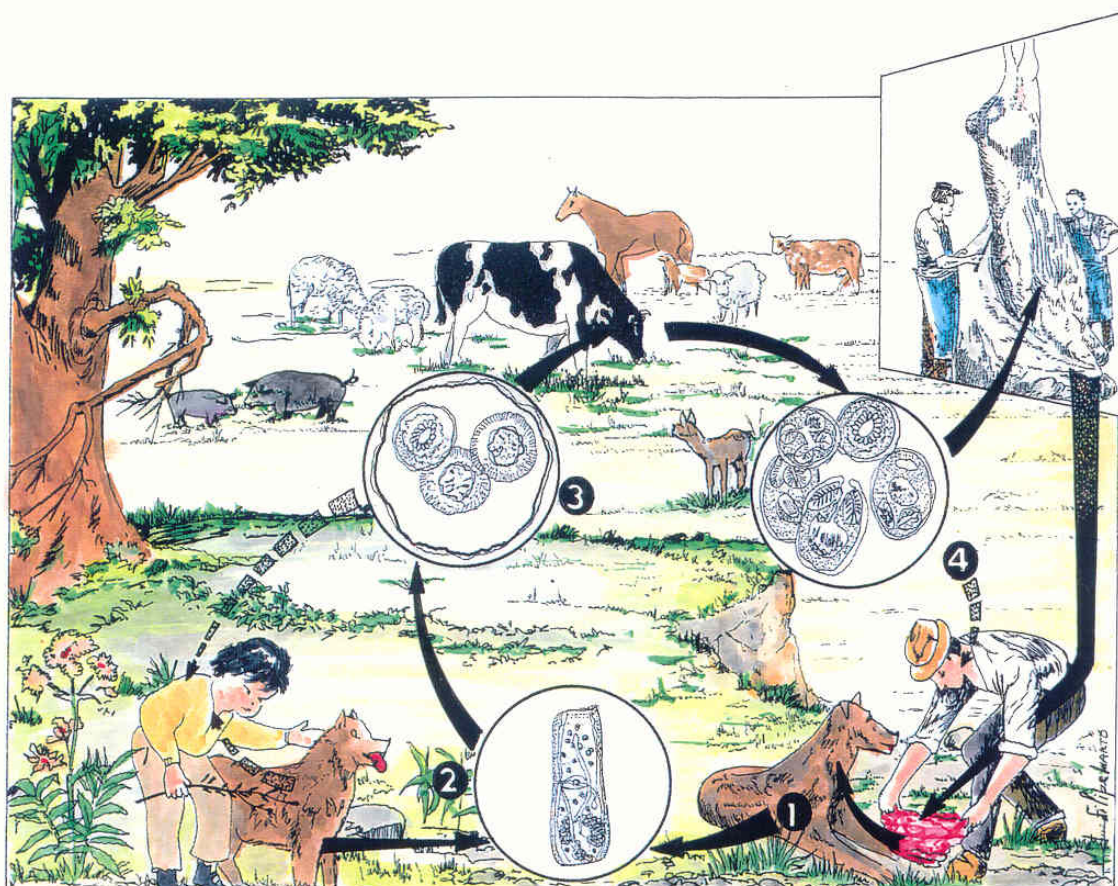


Figura 2 – Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*: 1 – O cão, hospedeiro definitivo, infecta-se ao ingerir as vísceras dos hospedeiros intermediários com metacístodes (quistos hidáticos); 2 – Os proglótides grávidos do parasita *E. granulosus* são libertados no intestino do cão e eliminados com as fezes para o exterior; 3 – Os ovos contaminam o solo, água, ar e o próprio pelo do cão; 4 – Os embriões hexacantos dão origem, nos hospedeiros intermediários, incluindo o Homem, à formação de hidátides ou quistos hidáticos (imagem adaptada de Trinca, 2001)

Quando os parasitas atingem a maturidade, as proglótides gravídicas podem libertar cerca de 1.000 ovos a cada duas semanas (Schantz *et al.*, 1995). Estas proglótides gravídicas, ou ovos, serão libertados nas fezes e irão contaminar os solos e vegetações circundantes. Os herbívoros são expostos à infecção nas pastagens ou em águas contaminadas, e que estão também em contacto com os carnívoros (Craig *et al.*, 1988). Os humanos podem ser infectados quando entram em contacto com os cães parasitados, especialmente em situações de jogos ou contactos mais próximos entre crianças e cães (figura 2). Está descrito que os ovos de *E. granulosus* podem aderir ao pelo dos cães e assim serem transmitidos a quem entra em contacto com os

CAPÍTULO 1

mesmos (Torgerson e Heath, 2003). Existem formas de contacto indirecto que também podem ter um papel importante na transmissão desta parasitose, como a ingestão de água, frutos ou vegetais contaminados (Carmona *et al.*, 1998), entre outros, podendo levar à infecção dos humanos (Torgerson *et al.*, 1998). Existem também factores de risco associados a esta parasitose que podem ir desde o tipo de actividade profissional que o individuo tem, ou o pouco cuidado com a higiene, baixo nível educacional/conhecimento do ciclo de vida/transmissão do parasita ou a associação próxima com os animais domésticos, especialmente em zonas rurais de países em vias de desenvolvimento, podendo ter um importante papel no potencial de infecção dos diversos hospedeiros (Macpherson, 2001).

Os ovos de *E. granulosus* são ingeridos por hospedeiros intermediários susceptíveis, onde a oncoesfera, contendo a larva sofre a acção das enzimas gastrointestinais levando a que esta se liberte de dentro do embrióforo antes de conseguir penetrar a parede do intestino. Este movimento de penetração na parede do intestino é auxiliado pela acção da bÍlis, pelo movimento dos ganchos que o parasita apresenta e por secreções lÍticas do próprio (Siracusano *et al.*, 2012). Três pares de ganchos na região oposta ao núcleo apresentam-se com um sistema muscular bastante desenvolvido, com a função de conseguir penetrar nos tecidos (Holcman e Heath, 1997). Assim, a oncoesfera liberta a larva das suas camadas protetoras, podendo facilmente atingir os tecidos da lâmina própria e penetrar nos mesmos. Ao penetrar, é transportada de forma passiva através da linfa e do sangue para os tecidos alvo (Zhang *et al.*, 2003), nos quais a larva se vai desenvolver de forma lenta em quisto hidático (Siracusano *et al.*, 2012). Estes quistos hidáticos desenvolvidos são compostos por duas camadas derivadas do parasita, uma interior denominada de camada germinativa a partir da qual as cápsulas e protoescólices se irão desenvolver e outra externa denominada de camada laminada, que se encontra envolta numa cápsula fibrosa derivada do hospedeiro (McManus *et al.*, 2003). Os protoescólices vão-se desenvolver dentro de cápsulas originárias, na camada germinativa, e podem dar origem a vesÍculas filhas (figura 2) (Rogan *et al.*, 2006). Os pulmões e o fÍgado são os órgãos mais atingidos por este parasita levando ao aparecimento do quisto hidático, embora exista um largo espectro de possibilidades de fixação da oncoesfera, como o baço, rins, cérebro, músculos, coração, pâncreas, osso, bexiga, entre outros

(Diaz *et al.*, 2011, Eckert *et al.*, 2001, Grácio, 1997). Quando ocorre a ruptura de um quisto hidático em qualquer parte do organismo, o conteúdo que existe dentro do mesmo dispersa-se e pode provocar uma reacção anafilática. Caso o hospedeiro sobreviva a esta reacção, pode ocorrer hidatidose secundária, que é quando novos quistos se desenvolvem em novos órgãos após a ruptura do primeiro (Eckert *et al.*, 2001).

Os humanos foram rotulados como um hospedeiro final para o parasita pois o ciclo de vida do mesmo normalmente é perpetuado através da ingestão dos hospedeiros intermediários herbívoros pelos hospedeiros definitivos carnívoros (McManus *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2003). Desta forma o ciclo de vida do *E. granulosus* mantém-se por diversas gerações.

1.3. Epidemiologia

E. granulosus é a espécie mais dispersa mundialmente dentro do género, com uma variedade de padrões de ciclo de vida que refletem a diversidade geográfica, epidemiológica e cultural das populações. Estudos epidemiológicos têm sido feitos, combinando a caracterização morfológica e biológica com a caracterização genética, levando à conclusão que os genótipos de *E. granulosus* variam em relação ao tipo de hospedeiro animal em estudo. *Echinococcus sp.* provavelmente evoluiu de uma população ancestral localizada no Norte da Europa, onde o ciclo predador-presa entre lobos e cervídeos estaria bem estabelecido (David de Moraes, 1998). O desenvolvimento da civilização humana, a colonização de diferentes regiões e a domesticação dos ungulados e canídeos levaram eventualmente ao aparecimento de outros ciclos de vida. O parasita pode ser encontrado por todo o mundo, com excepção de algumas zonas remotas da Gronelândia e em algumas áreas bem definidas, maioritariamente em ilhas, onde os programas de controlo da parasitose foram muito bem aplicados, como por exemplo na Islândia, Nova Zelândia e Tasmânia (Eckert e Deplazes, 2004).

A região mediterrânica é considerada endémica para *E. granulosus*. Foram descritos diferentes factores como sendo responsáveis pela manutenção da infecção,

CAPÍTULO 1

designadamente: a tradição na manutenção da criação de ovinos em regime extensivo; o contacto próximo entre humanos, cães e ovinos, em zonas rurais, havendo assim a possibilidade de ocorrência do ciclo de vida do parasita completo; a elevada taxa de cães errantes e abandonados; a continuidade do abate de animais no domicílio e a alimentação dos cães com as vísceras cruas potencialmente infectadas, dos animais abatidos; falta de programas de controlo e necessidade de um maior número de programas de Saúde Pública (Eckert e Deplazes, 2004, David de Moraes, 1998).

Em relação à hidatidose em Portugal, a sua incidência em humanos aumenta de Norte para Sul sendo o Alentejo a região do país com maiores níveis de incidência. Porém, os dados obtidos para a incidência da hidatidose animal variam no sentido contrário, aumentando de Sul para Norte. Pensa-se que a doença se encontra subestimada tanto nos animais como nos humanos, mas não há certezas devido à falta de estudos epidemiológicos à escala nacional (Reis *et al.*, 2014). Após um aumento ocorrido até à década de 80, parece que a doença em humanos está em declínio, provavelmente devido à ampla divulgação pública sobre regras básicas de higiene. Um outro motivo é a importância cada vez maior dada pela população à prevenção primária, como por exemplo a desparasitação regular dos cães e o estabelecimento de grupos multidisciplinares dedicados ao controlo da hidatidose, o que ocorre em algumas áreas da província do Alentejo (David Moraes, 2010). No entanto, esta província é considerada ainda endémica pelo Laboratório Nacional de Saúde Pública, ou seja, a totalidade do distrito de Évora. Entre 2008 e 2013, 35% dos novos casos positivos e 71% dos casos positivos seguidos, após a cirurgia de excisão do quisto hidático, vieram daquela área. No Norte, na província de Trás-os-Montes, o *E. granulosus* apresentou uma prevalência de 8-11%, 30% e 7-12%, em suínos, pequenos ruminantes e no cão, respectivamente. A alta prevalência nos cães pode ser atribuída ao facto de 80% dos cães serem alimentados com vísceras/carne crua e de 92% dos alunos do ensino básico terem cães (Reis *et al.*, 2014). Descobertas recentes de *E. granulosus* em lobos (G7) e quistos hidáticos em javalis, destacam a importância de hospedeiros selvagens e um possível ciclo selvagem ou o cruzamento do ciclo doméstico com o selvagem (Guerra *et al.*, 2013, Guerra, 2012). Assim, segundo os dados existentes em Portugal, a equinocose/hidatidose está a abrandar,

mas o seu estatuto endêmico em algumas localidades do Sul e do Norte, juntamente com as novas descobertas sobre a vida selvagem e baixo volume de informação, sublinham a importância de se estabelecer uma vigilância ativa da doença, permitindo uma oportuna criação de programas de Saúde Pública dirigida a populações-alvo.

1.3.1. Epidemiologia molecular

Os diferentes estudos moleculares realizados ao longo dos últimos anos vieram contribuir para o conhecimento da variabilidade genética do género *Echinococcus*. Contudo, as investigações iniciadas por Josephine Bowles *et al.* (1992), com o estudo de fragmentos dos genes mitocondriais NADH desidrogenase sub-unidade 1 e citocromo oxidase sub-unidade 1, foram a base do que actualmente se considera ser o conhecimento e prática na área. Inicialmente os estudos descreveram 7 diferentes genótipos ou estirpes de *E. granulosus* com base no estudo de fragmentos de 366pb da região do gene *cox1* em 49 isolados provenientes de diferentes hospedeiros e de diferentes áreas geográficas (Bowles, Blair e McManus, 1992). Com o passar dos anos houve uma continuidade no investimento na investigação e foram identificados outros genótipos tendo sido designados de G8 (Bowles *et al.*, 1994), G9 (Scott *et al.*, 1997) e G10 (Lavikainen *et al.*, 2003). Outros dados foram apresentados, incluindo a sequenciação completa do genoma mitocondrial, que levaram a diversas revisões taxonómicas de *Echinococcus spp.* (Nakao *et al.*, 2013, 2007, Saarma *et al.*, 2009, Thompson, 2008). Enquanto algumas estirpes provaram apenas estar relacionadas com outros agentes de hidatidose e consequentemente foram apresentadas como novas espécies, outras são apenas consideradas pequenas variantes, cuja validade de serem chamadas de genótipos é dúbia. A “estirpe do leão” ou *E. felidis*, apenas recentemente foi geneticamente caracterizada devido à falta de material biológico para tal. A maior controvérsia taxonómica, o *cluster* G6-G10, parece agora ter encontrado um rumo (Nakao *et al.*, 2013). Apesar de todas estas controvérsias parecerem estar resolvidas existem ainda algumas preocupações devido às consequências biológicas, médicas e económicas de toda esta diversidade. Para algumas das espécies e genótipos descritos, continuamos

CAPÍTULO 1

com algumas lacunas na informação como a distribuição geográfica, frequência relativa em humanos e animais, especificidade dos hospedeiros e patologia, sendo para tal necessário continuar com os estudos de investigação (Alvarez Rojas *et al.*, 2014).

O *Echinococcus granulosus s.s.*, composto pelos genótipos G1, G2 e G3, e descrito pela primeira vez por Bowles *et al.* em 1992 e 1993, a partir de sequências parciais dos genes *cox1* e *nad1*, apresentava uma baixa variabilidade genética, apesar deste primeiro estudo ter sido feito com base em pequenas sequências de genoma mitocondrial. Já nesse tempo tinha ficado patente que estes genótipos apresentavam uma maior relação genética entre eles que qualquer outra espécie ou estirpe descrita até aí (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Deste então, outros estudos foram realizados utilizando outros genes e/ou sequências genómicas maiores, tendo sido identificados vários haplótipos dentro do *cluster* G1-G3, e sido possível descrever G1 e G3 como genótipos e G2 como uma variante de G1 ou de G3 (Nakao *et al.*, 2013, Yanagida *et al.*, 2012, Casulli *et al.*, 2012, Snabel *et al.*, 2009, Vural *et al.*, 2008, Busi *et al.*, 2007). Segundo Yanagida *et al.* (2012), as diferenças geográficas na diversidade de *E. granulosus s.s.* sugere uma hipótese para a origem destas espécies no Oriente e subsequente dispersão para outras regiões. Apesar dos estudos apresentados, a variabilidade do *cluster* G1-G3 continua sem estar suficientemente esclarecida. Globalmente, o principal hospedeiro intermediário deste *taxa* é a ovelha, embora a infecção ocorra numa elevada variedade de gado e espécies selvagens de herbívoros por todo o mundo (Cardona e Carmena, 2013, Thompson e McManus, 2002). Na grande maioria das regiões mundiais os bovinos estão infectados por G1, estirpe descrita como a mais disseminada a nível mundial e que infecta maior número e maior variedade de hospedeiros intermediários, mas estes contribuem muito pouco para a transmissão da doença pois os quistos hidáticos são, na sua maior parte, estéreis (Thompson e McManus, 2002). O genótipo G3 foi descrito como a estirpe do búfalo, a partir de amostras provenientes de búfalos de água, mas também já foi descrita noutros hospedeiros intermediários e nos humanos.

Em relação ao *E. equinus*, este foi inicialmente descrito a partir de isolados provenientes de cavalos de Espanha e do Reino Unido, tendo sido definido como o genótipo G4. As sequências obtidas da sequenciação de um fragmento do gene *cox1*

demonstraram a existência de diferenças significativas deste genótipo para o G1. Quando Bowles e McManus (1993) compararam os fragmentos de nad1 obtidos, verificaram também diferenças bastante significativas (Bowles e McManus, 1993). Estudos morfológicos de isolados provenientes de cavalos do Reino Unido já tinham evidenciado que eles estariam parasitados com uma nova sub-espécie, facto que veio a ser comprovado com os estudos moleculares (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Esta espécie parece ocorrer de forma simpátrica com o genótipo G1 (Pezeshki *et al.*, 2013, Mwambete *et al.*, 2004). Li *et al.* (2002), analisaram o genoma mitocondrial completo de isolados do parasita, provenientes de cavalo, nomeadamente do conhecido até então genótipo G4. Actualmente está descrito como sendo uma espécie independente, a qual parece ser específica para hospedeiros intermediários da família Equidae (burros, cavalos e zebras) (Nakao *et al.*, 2013). Posteriormente foram identificadas infecções em cavalos do Reino Unido, Irlanda e países da Europa Central (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Mitrea *et al.* (2010) encontraram evidências sugestivas de que *E. equinus* ocorre de forma comum em alguns países de Europa de Leste (Mitrea *et al.*, 2014). Também foram descritas infecções em cavalos por *E. equinus* em países como África do Sul, Nova Zelândia, Estados Unidos da América (EUA), Itália e Espanha (Varcasia *et al.*, 2008, Mwambete *et al.*, 2004).

E. ortleppi, descrito por Ortlepp em 1934, em cães da zona de Pretoria, foi considerado como o *E. granulatus*, que provocava hidatidose em gado bovino (McManus e Thompson, 2003). *E. ortleppi* está disperso por algumas zonas da Europa, África e América do Sul, infectando bovinos, sendo os quistos produzidos tipicamente férteis. Bowles *et al.* (1992) caracterizaram um fragmento do gene *cox1* para um isolado de bovino proveniente da Holanda, tendo este formado a base para a designação do genótipo G5. Juntando a informação obtida da caracterização parcial dos genes *nad1* e *cox1*, com as características morfológicas e de desenvolvimento únicas, levou a que *E. ortleppi* fosse reconhecido como espécie (Thompson e McManus, 2002), a qual é actualmente reconhecida como a mais relacionada com os genótipos de *E. canadensis* (Nakao *et al.*, 2013). A espécie *E. ortleppi* parece estar adaptada a ter como hospedeiro intermediário o gado bovino, embora também possa ser encontrada noutras espécies de hospedeiros intermediários (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Na década de 1980 foi detectada a hidatidose nos bovinos de países da Europa

CAPÍTULO 1

Central, mas actualmente o parasita é considerado erradicado dos mesmos, ocorrendo apenas infecções esporádicas (Romig *et al.*, 2006). Foram também descritas infecções por esta espécie em gado no Sudão (Omer *et al.*, 2010, Dinkel *et al.*, 2004) e na Itália (Busi *et al.*, 2007) e em búfalos na Índia (Pednekar *et al.*, 2009). Também há registos da presença do parasita em porcos na Índia (Singh *et al.*, 2012), África (Dinkel *et al.*, 2004) e na América do Sul (de la Rue *et al.*, 2006, Kamenetzky *et al.*, 2002). Foi ainda referido um caso de hidatidose no Vietnam, num macaco, que se comprovou ser por *E. orteppi* (Plesker *et al.*, 2001).

No que concerne ao actualmente denominado *E. canadensis*, é composto pelos “antigos” genótipos G6 a G10 e por numerosas variantes e formas intermediárias (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). A designação do genótipo G6 seguiu-se a uma caracterização de um fragmento do gene *cox1* de isolados de camelos provenientes da Somália e Sudão e de um caprino do Quênia (Bowles *et al.*, 1992). Eckert *et al.* (1989) tinha descrito algumas diferenças morfológicas e de desenvolvimento de *E. granulosus* isolados de camelos aquando da comparação com a mesma espécie desenvolvida noutros hospedeiros intermediários, tendo confirmado estas diferenças em parasitas adultos obtidos a partir do hospedeiro intermediário, o cão. O genótipo G7 foi definido a partir da caracterização de dois isolados de porcos procedentes da Polónia (Bowles *et al.*, 1992). Subsequentemente foram confirmadas as diferenças das características morfológicas, de desenvolvimento, e genéticas, em isolados de porcos da Europa (Eckert *et al.*, 2001). Foi encontrado um elevado grau de similaridade entre os genótipos G6 e G7 quando se analisaram e compararam as sequências parciais do gene *cox1* (Bowles *et al.*, 1992), revelando a diferença de apenas um único nucleótido, e de três nucleótidos quando se compararam as sequências parciais do gene *nad1* (Bowles e McManus, 1993). A relação próxima destes dois genótipos veio a ser confirmada através da análise filogenética de fragmentos de gene nucleares e do genoma mitocondrial completo (Saarma *et al.*, 2009, Nakao *et al.*, 2007). Em estudos realizados nos últimos anos, os isolados analisados não permitiram fazer a separação entre os dois genótipos, sendo que os autores preferiram referir-se aos mesmos como genótipo G6/G7 (Mogoye *et al.*, 2013, Nakao *et al.*, 2013). Contudo, biologicamente existirão diferenças relevantes entre as variantes G6/7 (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Soriano *et al.* (2010) observaram

CAPÍTULO 1

na província Argentina de Neuquén, caprinos infectados por parasitas do genótipo G6, ao fazerem a caracterização molecular e obterem 100% de homologia com as sequências originalmente descritas como G6, e suínos infectados por parasitas do genótipo G7, (100% de homologia com a sequência de G7 descrita por Bowles *et al.* em 1992) (Soriano *et al.*, 2010). Existem dúvidas sobre até que ponto estes dois genótipos ocorrem de forma simpátrica e qual a sua real importância epidemiológica. A primeira descrição do genótipo G6 provém de isolados de camelos da Somália e Sudão e de um caprino no Quênia (Bowles *et al.*, 1992). Em 2011 foi feito um estudo epidemiológico no Sudão, tendo sido identificado o genótipo G6 como o único responsável pela hidatidose naquele país, tendo sido obtidos 570 isolados provenientes de camelos, bovinos, ovinos e caprinos (Romig *et al.*, 2011), apresentando assim uma variedade de hospedeiros intermediários maior para este genótipo. Quanto ao genótipo G7, este parece ter como principal hospedeiro intermediário, na Europa Central e de Leste, o porco (Cardona e Carmena, 2013), variando depois em determinadas regiões. Na Grécia foi identificado o genótipo G7 em caprinos (Varcasia *et al.*, 2007), na América do Sul em porcos e alpacas (Sanchez *et al.*, 2012, Moro *et al.*, 2009, Kamenetzky *et al.*, 2002,), na América do Norte em porcos (Villalobos *et al.*, 2007), na Roménia em javalis selvagens (Rostami Nejad *et al.*, 2012) e em Portugal em porcos (Castro *et al.*, 2005). A distribuição global destes dois genótipos permanece inexplicada nos hospedeiros intermediários (Cardona e Carmena, 2013), tendo sido as técnicas utilizadas para a diferenciação dos mesmos quase sempre as mesmas, bem como os mesmos *primers* (Dinkel *et al.*, 2004).

Bowles *et al.* (1994) iniciaram a caracterização molecular de isolados obtidos de dois alces nos EUA (Minesota e Alasca) utilizando sequências parciais de genes mitocondriais (Bowles *et al.*, 1994), tendo obtido um genótipo distinto dos anteriormente descritos, sendo este designado de genótipo G8. Outro grupo de investigadores caracterizou isolados provenientes de cervídeos da Finlândia e Suécia, os quais eram muito semelhantes entre si, mas diferentes do genótipo associado aos cervídeos e caracterizado anteriormente como G8 (Lavikainen *et al.*, 2006, 2003). Assim, a este novo genótipo foi dada a designação de genótipo G10. Foi sugerido que este novo genótipo representava uma forma indígena da Fenoescandinávia, mas mais tarde foi comprovado que os genótipos G8 e G10 ocorriam, ambos, na América

CAPÍTULO 1

do Norte e no norte dos continentes Europeu e Asiático, usando cervídeos (maioritariamente alces e renas) como hospedeiros intermediários (Alvarez Rojas *et al.*, 2014, Nakao *et al.*, 2013, Moks *et al.*, 2008, Thompson *et al.*, 2006,).

Com base nas diferenças nos tipos de hospedeiros intermediários e na distribuição geográfica entre o ciclo silvático (G8 e G10) e o ciclo semi-doméstico (G6 e G7) foi sugerido que os genótipos G6 e G7 fossem considerados como espécies separadas das anteriores, adoptando o nome de *Echinococcus intermedius* (Thompson *et al.*, 2008, Sharma *et al.*, 2013). Após estudo filogenético destes diferentes genótipos com base no genoma mitocondrial completo, chegou-se à conclusão que G10 é filogeneticamente mais próximo de G6/7 do que de G8, tornando impossível a sugestão taxonómica anterior. Com base apenas na divergência de sequências, G8 poderia possivelmente ser tratado como uma espécie separada de G6/7/10, mas esta informação necessita ser confirmada com outros estudos genéticos, como a sequenciação de genes nucleares e com caracterização biológica e morfológica dos mesmos (Nakao *et al.*, 2013).

Scott *et al.* (1997) encontraram num isolado humano da Polónia, padrões únicos utilizando PCR-RFLP para um fragmento do gene ITS1, sendo posteriormente sequenciado um fragmento do gene nad1 apresentando uma homologia igual ao genótipo G7 (Scott *et al.*, 1997). Partindo desta informação, foi proposto um novo genótipo, o G9. Análises posteriores em isolados humanos e suínos da Polónia bem como da Eslováquia e da Ucrânia (Kedra *et al.*, 1999) demonstraram ser impossível identificar o genótipo G9. Neste estudo foi verificado que a fonte de infecção para humanos e porcos era a mesma. O gene ITS1 é um marcador altamente polimórfico, daí que tenha sido questionado o uso deste marcador como adequado para estudos taxonómicos (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Assim, a validade do genótipo G9 necessita ser comprovada (McManus, 2006). Na ausência de informações que suportem a existência deste genótipo, o isolado humano descrito por Scott *et al.* (1997) é considerado como genótipo G7.

E. felidis foi originalmente descrito em leões africanos, tendo sido incluído no *E. granulosus* como uma sub-espécie *E. g. felidis* ou a “estirpe do leão”. Devido à falta de material para análise genética esta não foi incluída como um genótipo (G) de

E. granulosus. Recentemente foi possível proceder à caracterização molecular a partir de amostras de leões do Uganda e de parasitas adultos preservados, provenientes da África do Sul. Até à data apenas se conhece o leão como hospedeiro definitivo e um isolado de javalis africanos do Uganda (Hüttner *et al.*, 2009, 2008, Hüttner e Romig, 2009). Com base na análise do genoma mitocondrial, associa-se este ao *E. granulosus s.s.* sugerindo que as características biológicas do *E. felidis* se assemelham às do *E. granulosus s.s.* (Alvarez Rojas *et al.*, 2014, Nakao *et al.*, 2013).

1.4. Marcadores moleculares

Quando se refere *E. granulosus* não se fala apenas numa espécie, mas num complexo de genótipos que posteriormente deram origem a um complexo de espécies. Este grupo de parasitas apresenta uma variabilidade intra-específica em todo o mundo dificultando muitas vezes a identificação dos mesmos (Adwan *et al.*, 2013). Para o estudo da variabilidade deste complexo grupo de parasitas, muitas técnicas têm sido testadas ao longo dos tempos. Os primeiros marcadores genéticos a serem estudados foram dois fragmentos de dois genes mitocondriais, o citocromo c oxidase subunidade 1 (COI ou Cox1) e o NADH desidrogenase subunidade 1 (NDI ou nad1) os quais revelaram a existência de algumas diferenças genéticas entre os exemplares de *Echinococcus* estudados (Bowles *et al.*, 1992, Bowles e McManus, 1993). Este foi o início do estudo do genoma mitocondrial do *E. granulosus* que, com o decorrer do tempo e das diversas investigações realizadas, tornou possível dividir o complexo em 10 genótipos diferentes, G1 a G10 (Lavikainen *et al.*, 2003, Thompson e McManus, 2002, Scott *et al.*, 1997, Bowles e McManus, 1993, Bowles, Blair e McManus, 1992).

Com este tipo de estudos foram abertos novos campos de investigação, iniciando-se a comparação genotípica com a fenotípica. Ao serem feitas estas avaliações descobriu-se que a variabilidade genética poderia influenciar muitas características fenotípicas, nomeadamente padrões do ciclo de vida, taxa de desenvolvimento do parasita, distribuição geográfica, especificidade em relação ao hospedeiro intermediário, dinâmicas de transmissão, infecciosidade, antigenicidade, controlo das patologias associadas e a susceptibilidade a agentes quimioterapêuticos

CAPÍTULO 1

(Adwan *et al.*, 2013, Thompson, 2008). Os estudos da variabilidade genética com/entre a população de *E. granulosus* poderão vir a ter bastante importância em programas de controlo das patologias dado que irão influenciar a idealização e o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, produção de vacinas (quer nos hospedeiros intermediários, quer nos definitivos) e em tratamentos mais eficientes contra este parasita, patologias associadas e a epidemiologia do mesmo (Grosso *et al.*, 2012, Bhattacharya *et al.*, 2007, de la Rue *et al.*, 2006).

Durante os anos em que foi desenvolvido o estudo do genoma mitocondrial do complexo *E. granulosus*, muitos investigadores trabalharam para conseguir discernir as implicações que a variabilidade genética poderia ter no funcionamento da mitocôndria do parasita, tendo sido totalmente sequenciado o genoma mitocondrial dos céstodes no ano 2000 (Nakao *et al.*, 2000). Sabe-se que a maior parte das proteínas necessárias ao funcionamento da mitocôndria são produzidas pelo genoma nuclear e que apenas algumas são da responsabilidade da mitocôndria, a qual desempenha um importante papel na respiração celular. Foi necessário conhecer os constituintes deste genoma circular para poder continuar a sequenciação de outros elementos desta população. Este genoma codifica cerca de 12 subunidades proteicas de enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa, dois rRNAs e 22 tRNAs associados à síntese proteica na mitocôndria (Nakao *et al.*, 2000).

O genoma mitocondrial é uma fonte rica em dados para estudos de biologia da evolução, genética populacional e análise filogenética, o que tem vindo a ser feito com o genoma de *Echinococcus* (Nakao *et al.*, 2013, Le *et al.*, 2002, Nakao *et al.*, 2000). Estão na atualidade sequenciados quase todos os genomas mitocondriais dos elementos do complexo de espécies de *E. granulosus*, sendo que os últimos a serem sequenciados foram o do *E. felidis* e o do *E. granulosus* G10 (cervídeo Fenoescandinavo) (Nakao *et al.*, 2013).

Nos últimos anos começaram a ser feitos estudos ao nível do genoma nuclear de forma a se conhecer mais acerca deste parasita. Ao serem estudados os dois tipos de genomas, começaram-se a encontrar diferenças em termos de taxa de mutação, localização geográfica das mesmas, entre outras, levando os investigadores a estudar a importância de usar um tipo de genoma e o outro ou os dois em simultâneo

(Saarma *et al.*, 2009). Sabe-se que os fragmentos mitocondriais apresentam algumas limitações pois estes focam-se apenas numa porção do genoma que tem uma forma muito específica e particular de transmissão entre gerações. Contrariamente ao genoma nuclear, o DNA mitocondrial é assumido como tendo uma herança uniparental (excepto em casos raros). Por outras palavras, é universalmente aceite que diferentes linhagens de mitocôndrias não recombinam entre si, apesar de ter havido alguns estudos que indicam que este facto não ocorre com o *E. granulosus*, pensando-se que pode haver cruzamentos (Haag *et al.*, 1999, 1998). Existem ainda estudos que revelam que no *Schistosoma mansoni* há cruzamento de informação entre múltiplas gerações, especulando-se que o mesmo possa também ocorrer no *E. granulosus* (Jannotti-Passos *et al.*, 2001). Consequentemente, o uso exclusivo de marcadores mitocondriais na tipificação de estirpes, apresenta, pelo menos teoricamente, o risco de perda de informação importante nas modificações genéticas entre elementos da mesma população. Por isso, apenas a análise do genoma mitocondrial torna-se ineficiente para uma correcta identificação filogenética deste complexo de espécies (Bart *et al.*, 2004, Le *et al.*, 2002). Na atualidade usam-se marcadores mitocondriais mais abrangentes como ATP6 (ATP sintase F0 subunidade6) ou citocromo B e também alguns marcadores nucleares começaram a ser usados para haver complementaridade de estudos, tendo alguns investigadores proposto o estudo de fragmentos de DNA nuclear tais como regiões rDNA ITS (Okamoto *et al.*, 1995). Resumindo, apesar de algumas desvantagens, o genoma mitocondrial apresenta a vantagem de ser haplóide, de apresentar múltiplas cópias, ser neutro e dar acesso a diferentes genes em que não há recombinação (Saarma *et al.*, 2009). Com os estudos feitos nos últimos anos pensa-se que poderão existir inserções de sequências mitocondriais no genoma nuclear e vice-versa (Leister, 2005). Nakao *et al.* (2007) demonstraram que as análises filogenéticas usando apenas genoma mitocondrial não são concordantes com as mesmas análises usando genes nucleares, havendo alterações significativas nas posições que ocupam as diferentes espécies de *Echinococcus* (Saarma *et al.*, 2009).

1.5. Patologia e resposta imune

Os hospedeiros definitivos são infectados pelo estadio adulto do parasita *Echinococcus spp.* Esta é chamada de forma intestinal da Equinococose. Assim, há uma adaptação do intestino do hospedeiro definitivo levando a que alterações histológicas ocorram em resposta à fixação do parasita (por exemplo: adesão à mucosa intestinal devido a infiltração celular ou aumento da produção de muco), mas geralmente esta infecção é totalmente assintomática nos hospedeiros definitivos, embora a presença de proglótides gravíticos no lúmen do ânus possam provocar algum prurido (Eckert *et al.*, 2001). A libertação de produtos de excreção/secreção por parte do parasita leva a uma estimulação da resposta imune no hospedeiro definitivo. Estudos experimentais em cães infectados demonstraram ser possível detectar anticorpos contra os antigénios dos protoescólices cinco dias após infecção dos mesmos e contra os produtos de excreção/secreção dos antigénios do escólex dez dias após infecção (Jenkins e Rickard, 1986). Moreno *et al.* (2004) detectaram um aumento constante das IgG contra os antigénios dos protoescólices durante pelo menos 14 dias após infecção experimental de 6 cães. Também foram detectadas IgA e IgE, mas os seus títulos variavam dentro dos animais em estudo. Embora se associe a resposta imune por parte do hospedeiro contra o parasita, os estudos têm falhado quando querem correlacionar os títulos de IgG com a quantidade de parasitas que infectam o animal (Gasser *et al.*, 1988). Apesar de não se terem obtido resultados concretos quanto ao desenvolvimento da resposta imune por parte das imunoglobulinas, é do conhecimento científico que há evidências de resposta tanto humoral como celular, contra o *E. granulosus* nos hospedeiros caninos (Guerra *et al.*, 2013). Há também dados que sustentam que existe algum grau de protecção contra a reinfeção destes hospedeiros (Torgerson, 2006) e que após uma primo-infecção, os cães desenvolvem uma resposta imune humoral muito mais marcada (Rossi *et al.*, 2012).

A hidatidose quística é a forma de equinococose nos hospedeiros intermediários e acidentais, causada pelo *E. granulosus*. O crescimento do metacéstode é normalmente lento e são necessários vários anos para que se desenvolvam sinais clínicos de doença que, dependendo do hospedeiro, assim será o

CAPÍTULO 1

tempo necessário (por exemplo 10-12 meses em suínos; 2-4 anos em ovinos) (Eckert *et al.*, 2001). Assim, como a maior parte dos animais que servem de hospedeiros intermediários são abatidos nos primeiros anos de vida, há muitas infecções subclínicas que apenas se diagnosticam no abate pelos profissionais das inspeções veterinárias. Os sinais clínicos são raros e dependem fortemente da localização, dimensão, número de quistos e qual a sua relação com as estruturas adjacentes. Na maior parte dos hospedeiros intermediários a grande maioria dos quistos encontra-se no fígado e nos pulmões, sendo que as alterações na função hepática são as mais encontradas nestes hospedeiros (Eckert *et al.*, 2001).

Após infecção do hospedeiro intermediário, o ovo e os antigénios da oncoesfera são reconhecidos quer pela resposta humoral, quer pelas respostas mediadas por linfócitos T. Nesse instante as respostas imunes iniciam a sua acção (Siracusano *et al.*, 2012) o que permite algum controlo sobre o parasita bem como a imunidade contra uma possível re-infecção (Zhang, Ross e McManus, 2008). Embora a imunidade celular seja referida como existindo e tendo um papel na defesa do hospedeiro, os seus mecanismos ainda não estão totalmente conhecidos (Zhang *et al.*, 2003). Apesar de experimentalmente se ter demonstrado algum grau de imunidade por parte dos hospedeiros intermediários após infecção, tem que se ter em conta que foi usado um número maior de parasitas que o normalmente encontrado em condições naturais em que existe uma grande percentagem de animais parasitados com mais idade (Eckert e Deplazes, 2004).

A membrana laminada do quisto hidático induz uma resposta reguladora por parte do parasita o que leva a uma atenuação da resposta imune inata do hospedeiro. Existem também, envolvendo o metacéstode, tecidos do hospedeiro que formam uma camada adventícia feita de fibras de colagénio e algumas células inflamatórias, levando a que a evolução crónica seja possível (Diaz *et al.*, 2011).

A fertilidade dos quistos depende da espécie do hospedeiro intermediário e da infecciosidade da estirpe de *Echinococcus*. Em Portugal a maior parte das infecções é provocada por *Echinococcus sensu stricto* e a grande percentagem de quistos férteis é encontrada no fígado de ovinos. Apesar de haver também registos de quistos férteis em bovinos, a maioria destes são estéreis (, David de Morais, 1998). Paredes *et al.*

(2011) encontraram elevada concentração de IgGs na camada germinativa de quistos inférteis em bovinos. De acordo com os autores, a fertilidade dos quistos poderá estar relacionada com algum grau de resposta imune por parte dos hospedeiros.

1.6. Diagnóstico

Existe uma vasta variedade de técnicas de diagnóstico disponíveis para *E. granulosus*. A escolha do método a utilizar vai depender:

- a. do objectivo do estudo;
- b. da origem da amostra/isolado (hospedeiro definitivo ou intermediário, isolado de origem humana ou animal, isolado de animal domestico ou selvagem);
- c. se se trata de um diagnostico/estudo em hospedeiros vivos ou em amostras obtidas de hospedeiros abatidos;
- d. do equipamento e recursos financeiros disponíveis.

Seja qual for a técnica escolhida, por razões de segurança, os materiais infecciosos (quistos hidáticos, intestinos, fezes, etc.) deverão ser primeiro congelados a -70°C pelo menos durante 4 dias ou a -80°C durante pelo menos 2 dias (Eckert *et al.*, 2001). O material de protecção pessoal e a descontaminação do material utilizado também nunca podem ser negligenciados.

1.6.1. Diagnóstico nos hospedeiros definitivos

Os ovos de *Echinococcus spp.* podem ser encontrados em amostras de fezes de hospedeiros intermediários e acidentais. Para posterior observação ao microscópio ótico pode ser utilizado um método de concentração com uma solução saturada de sulfato de zinco e sacarose (Mathis, Deplazes e Eckert, 1996). Estes autores desenvolveram um método baseado em flutuação e peneiração que permite uma maior sensibilidade na recolha de ovos nas fezes. Como exemplo, um estudo efetuado na Lituânia com 240 cães encontrou uma prevalência de 14,2% com esta técnica, contra apenas 5,0% usando o método de MacMaster modificado (Bružinskaitė *et al.*, 2009). Apesar de ser rápido, barato e ideal para um diagnóstico

CAPÍTULO 1

de rotina, a este método só lhe falta sensibilidade, uma vez que só pode detectar infecções patentes, podendo aparecer resultados falsos negativos devido à baixa carga parasitária, libertação irregular de ovos ou proglótides grávidos intactos nas fezes. Colhendo amostras em distintos dias, bem como analisando maiores quantidades de fezes, poder-se-á fazer aumentar a sensibilidade (Torgerson e Deplazes, 2009). Em casos raros, proglótides podem ser encontrados nas fezes, o que pode permitir a identificação da espécie (Eckert *et al.*, 2001).

A purga com bromidrato de aerocolina era uma técnica comum no passado (Deplazes *et al.*, 2011, Kamiya, 2007,). A droga, administrada por via oral, agia como um agente parasimpaticomimético que paralisava os vermes e estimulava a motilidade do músculo liso intestinal. Isto levava, eventualmente, à eliminação do parasita adulto nas fezes fazendo com que aumentasse a hipótese da sua identificação (Eckert *et al.*, 2001). Este método tem praticamente 100% de especificidade, mas a sensibilidade pode ser inferior a 65%. É também um método demorado, com potenciais riscos de segurança, não só para os animais, mas também para os seres humanos já que há lugar a libertação para o ambiente de vermes adultos e ovos (Torgerson e Deplazes, 2009).

A técnica mais utilizada para o diagnóstico nos carnívoros, tanto de *E. granulosus* como em outras espécies do mesmo género, é a Sedimentação e a Técnica de Contagem (SCT). Objectivamente, o intestino delgado deve ser dividido em cinco secções e incubado em solução salina fisiológica. Após a remoção do intestino, o líquido restante é deixado para sedimentação e decantação em sucessivas etapas. Os vermes podem ser visualizados e quantificados utilizando um microscópio estereoscópico (Kamiya, 2007). Embora este método não necessite de equipamento muito avançado, é considerado eficaz em termos de custos, mas é demasiado demorado não sendo adequado para um elevado número de amostras. Baseados na técnica descrita anteriormente, Umhang *et al.* (2011) descreveram uma adaptação a partir desta técnica, a Sedimentação Segmentar e Técnica de Contagem (SSCT), onde apenas dois segmentos do intestino delgado foram rastreados, tendo encontrado uma sensibilidade semelhante à descrita anteriormente. Existem ainda outras técnicas utilizadas para este tipo de diagnóstico, mas que por um ou outro motivo não são tão utilizadas, como a Técnica de Raspagem Intestinal (IST) (Kamiya, 2007). Esta

CAPÍTULO 1

técnica é menos sensível (78%) para *Echinococcus sp.* do que a SCT (100%), tendo a vantagem de ser menos morosa (Hofer *et al.*, 2000).

Técnicas mais avançadas têm sido desenvolvidas para o diagnóstico de espécies de *Echinococcus*. Diversos testes de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para pesquisa de copro-antígenos estão disponíveis para a detecção de antígenos nas amostras fecais de canídeos (Deplazes *et al.*, 1999, Allan *et al.*, 1992, Deplazes *et al.*, 1992). Alguns são específicos para uma das espécies, ao passo que outros detectam, quer *E. granulosus*, quer *E. multilocularis*, e podem ser utilizadas tanto em hospedeiros vivos como mortos, permitindo o rastreio de um elevado número de amostras simultaneamente. Além disso, as infecções pré-patentes podem ser detectadas. Deplazes *et al.* (1992) foram capazes de detectar amostras positivas entre 10 a 20 dias pós-infecção. No entanto, resultados falso-negativos podem ocorrer em áreas com baixa prevalência e também devido à reatividade cruzada com antígeno de *Taenia* (Torgerson e Deplazes, 2009, Christofi *et al.*, 2002).

Estão disponíveis métodos serológicos para a detecção de anticorpos no soro de hospedeiros definitivos infectados, e são capazes de dar resultados positivos em menos de duas semanas após a infecção (Moreno *et al.*, 2004). No entanto, como mencionado anteriormente, não foi encontrada nenhuma correlação entre os títulos de anticorpos e a carga parasitária. Além disso, para estudos epidemiológicos especialmente em populações selvagens este método apresenta sérias limitações.

Técnicas baseadas na PCR são altamente específicas, permitindo detetar espécies e por vezes identificar estirpes, podendo ser utilizadas em ovos recuperados a partir das fezes. Uma vez que são técnicas demoradas e dispendiosas, a utilidade em estudos de grande escala, nomeadamente epidemiológicos, é questionável. Quando a análise é feita em amostras colhidas de fezes, este método irá sofrer a mesma baixa sensibilidade e limitações como mencionado anteriormente para técnicas coprológicas, nomeadamente a detecção das infecções patentes. Além disso, os inibidores fecais podem interferir nos resultados da PCR (Torgerson e Deplazes, 2009). Uma forma de ultrapassar esta situação poderá passar por os ovos serem isolados através de uma técnica de peneiração-flutuação (Mathis *et al.*, 1996) que,

combinada com a PCR, apresenta sensibilidade tão alta como 78% e especificidade de 93% (Ziadinov *et al.*, 2008). Várias técnicas baseadas na PCR estão agora disponíveis para o diagnóstico em diferentes tipos de amostras (Armua-Fernandez *et al.*, 2011, Trachsel, Deplazes e Mathis, 2007, Stefanic *et al.*, 2004, Abbasi *et al.*, 2003,). A sequenciação dos produtos amplificados em PCR pode ser usada para a caracterização de espécies de *Echinococcus* e para diferenciação das estirpes de *E. granulosus*.

1.6.2. Diagnóstico nos hospedeiros intermediários

Como a grande maioria das infecções por *Echinococcus* são assintomáticas, o diagnóstico *post mortem* (matadouros) é a melhor forma de fazer diagnóstico nos hospedeiros intermediários. Esta forma de diagnóstico ocorre maioritariamente em matadouros através da inspecção visual das vísceras, especialmente do fígado e pulmões. Contudo, as prevalências obtidas a partir dos matadouros poderão ser subestimadas visto que a maior parte dos animais, nomeadamente os ovinos, são abatidos muito jovens quando os quistos hidáticos podem ser tão pequenos que não se conseguem detectar (Kamiya, 2007, Eckert e Deplazes, 2004).

Num estudo realizado no Quênia em 300 pequenos ruminantes observados *post mortem* e em que foram utilizados apenas métodos imagiológicos, como a ecografia, para a observação de pulmões e fígado, foi obtida uma sensibilidade de apenas 54,36% e uma especificidade de 97,64% (Sage *et al.*, 1998). Os métodos serológicos podem ser úteis quando usados para detectar antígenos de quisto hidático em animais muito jovens onde a identificação de quistos pode ser muito difícil de fazer (Eckert *et al.*, 2011). Contudo, como estes métodos apresentam uma sensibilidade baixa, são normalmente mais adequados para identificar parasitas no rebanho geral, do que para um diagnóstico individual (Eckert e Deplazes, 2004).

Quanto aos exames de imagem como a radiologia convencional, a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética são bastante úteis para a detecção dos quistos. Em muitos casos o diagnóstico pode ser sugerido por um simples telerradiografia de rotina. O diagnóstico pré-operatório do quisto hidático pode ser feito por ecografia e confirmado por tomografia computadorizada

CAPÍTULO 1

(Brown *et al.*, 1995). A ecocardiografia e a ressonância magnética têm grande valor diagnóstico nos quistos cardíacos além de determinarem a sua relação com os tecidos adjacentes (Alehan *et al.*, 1995). Nos casos de hidatidose intra-craniana, a ressonância magnética apresenta-se como um exame de diagnóstico bastante importante (Kohli *et al.*, 1995).

Os exames imagiológicos, além da importância que têm para a confirmação diagnóstica, são úteis no diagnóstico diferencial em relação a outras massas tumorais semelhantes (Marrone *et al.*, 2012). No Homem faz-se o diagnóstico por combinação de imagiologia com serologia (Trinca, 2001) tornando-o desse modo mais fiável e sensível.

As técnicas de biologia molecular podem ser usadas para a identificação de espécies e de estirpes. A técnica de *Random Amplified Polymorphic DNA-PCR* (PCR-RAPD) foi desenvolvida por Scott e McManus em 1994, para a distinção de espécies do género *Echinococcus* e entre genótipos de *E. granulosus* (Scott e McManus, 2004). Também a PCR associada a fragmentos de restrição (PCR-RFLP) foi usada com sucesso para a distinção entre genótipos de *E. granulosus* em quistos hidáticos isolados a partir de hospedeiros intermediários (Beato, 2009).

1.7. Tratamento

O diagnóstico nos hospedeiros intermediários é normalmente feito *post mortem*, logo após abate no matadouro. Quando efectuado em animais vivos, a sua eficiência e o custo que acarreta não compensam tratar estes hospedeiros intermediários (Kamiya, 2007). No caso dos humanos já é algo diferente e implica vários tipos de tratamento.

O objectivo do tratamento ao quisto hidático é a morte do parasita e consequentemente a cura da doença (Menezes da Silva, 2003, Sayek e Onat, 2001, Wen, New e Craig, 1993). O tratamento tem que ser efectuado com risco mínimo e máximo conforto para o paciente, prestando sempre atenção para se evitar complicações, hidatidose secundária, e recaídas. Os métodos para atingir a morte do parasita poderão ser médicos, como o uso de fármacos, ou cirúrgicos, nomeadamente

CAPÍTULO 1

a esterilização do conteúdo do quisto, o uso de agentes escolícidas, a remoção directa do parasita por meio de aspiração ou a excisão cirúrgica de todo o quisto (Brunetti e Junghanss, 2009, Junghanss *et al.*, 2008).

A esterilização do quisto baseia-se na degeneração da membrana germinal do quisto e da destruição dos elementos viáveis do líquido hidático, devido ao efeito de drogas escolícidas, injectadas no quisto ou administradas por via oral ou por ablação térmica (radiofrequência).

Quanto à administração oral de drogas escolícidas, o albendazol é o fármaco escolhido actualmente para o tratamento oral de quistos hidáticos (Menezes da Silva, 2010). O seu metabolito, o sulfoxido de albendazol, é o componente activo com uma meia-vida de 8,5 horas (Riget *et al.*, 2004). O albendazol é administrado por via oral, a cada 12 horas, numa dose total de 10-15 mg / kg / dia, durante um período chamado de ciclo terapêutico. O efeito do escolícida depende do estadio de desenvolvimento da hidátide e da integridade da membrana germinativa também (mais eficaz sobre os quistos jovens, e em menos quistos com mais de 50% de calcificação) (Menezes da Silva, 2003). O albendazol também é utilizado em cirurgia para reduzir a tensão do quisto interno, impedindo a hidatidose secundária (Brunetti e Junghanss, 2009, Junghanss *et al.*, 2008).

Quanto à injeção de uma solução escolícida na cavidade do quisto, este é o método mais antigo de tratamento para os quistos hepáticos (Dimerlau, 1973), tendo sido considerado o melhor método para o tratamento de quistos simples. Este método consiste na punção do quisto e aspiração de uma parte do conteúdo para permitir a introdução da solução escolícida. Esta solução deve permanecer na cavidade quística durante pelo menos 10 minutos. Depois, a cavidade quística deve ser totalmente aspirada. No passado, esta abordagem só foi feita por laparotomia, mas hoje em dia existem mais duas abordagens: laparoscopia e punção percutânea.

A punção percutânea é conhecida como PAIR (Punção, Aspiração, Injeção (do escolícida) e Re-aspiração) e é considerada a técnica padrão para a abordagem destes quistos (Silva, 2010, Brunetti e Junghanss, 2009, Junghanss *et al.*, 2008, Brunetti *et al.*, 2002, Giorgio *et al.*, 2001, Gargouri *et al.*, 1990,) uma vez que é uma técnica minimamente invasiva, é menos dolorosa para o paciente, possui uma taxa de

CAPÍTULO 1

complicação inferior, é mais barata, permite dar alta mais rapidamente e a retoma à atividade mais curta (Silva, 2010, Brunetti e Junghanss, 2009, Junghanss *et al.*, 2008, Brunetti *et al.*, 2002).

A ablação térmica por radiofrequência provou ser um método seguro para destruir a camada germinal (Brunetti e Junghanss, 2009, Junghanss *et al.*, 2008, Brunetti *et al.*, 2004, Brunetti e Filice, 2001), podendo ser realizado por via percutânea utilizando o mesmo tipo de instrumentos utilizados na ablação de tumores hepáticos. Como o conteúdo do quisto é destruído por calor em vez de o ser por meio de um agente químico, o processo é mais simples do que o tratamento PAIR, uma vez que evita a necessidade de injectar um agente escolicida (Brunetti *et al.*, 2004, Brunetti e Filice, 2001). No entanto, são necessárias mais investigações antes que possa ser recomendada como tratamento percutâneo eficaz.

Outra forma de promover a cura da doença é a remoção do parasita. Há duas maneiras diferentes de remover o parasita: a aspiração do parasita (ou quisto hidático) ou a excisão do quisto, o que necessariamente elimina o parasita, procedimento chamado quistectomia. Estes procedimentos apresentam similaridades com os referidos anteriormente, mas são cirurgias que apresentam as suas limitações e riscos inerentes (Junghanss *et al.*, 2008, Schipper *et al.*, 2002, Saremi e McNamara, 1995, Magistrelli *et al.*, 1991).

No que concerne aos hospedeiros intermediários animais, o tratamento com derivados de imidazóis, tais como mebendazol foram estudados em ovinos e suínos, mas concluiu-se que para ser um tratamento efectivo eram necessários vários dias de tratamento consecutivo o que não era viável para os produtores (Eckert *et al.*, 2001). Foi, então, desenvolvida uma vacina recombinante (Eg95) a qual comprovou atribuir 100% de protecção nos ovinos. Também se verificou que era efectiva em caprinos e em bovinos. A vacina é administrada em duas doses injectadas de forma sub-cutânea com um mês de intervalo entre as mesmas e é efectiva durante o máximo de 12 meses (Heath, Jensen e Lighttowers, 2003). Contudo ao vacinar estes hospedeiros intermediários não se está a tratar possíveis quistos hidáticos que eles possam já ter, logo, são necessárias outras medidas de controlo nestes animais já infectados, nomeadamente tratá-los (Eckert *et al.*, 2001).

1.8. Medidas de controlo

A hidatidose nos últimos anos tem passado por um período de aumento da sua prevalência como diversos estudos o comprovam, tendo incrementado de forma exponencial nos países de Leste Europeu (Piccoli *et al.*, 2013) o que indicia que programas de controlo mais eficazes necessitam ser implementados e os que existem necessitam ser revistos, pois estamos perante uma patologia com grandes perdas económicas para os seus produtores e que põe em risco milhões de humanos por todo o mundo.

Para que um programa de controlo sanitário possa ser implementado é necessário ter estudos de base que possam ser a longo termo e que possam avaliar a população alvo, de forma correcta, e extrapolar a população em risco, no caso, saber a prevalência e incidência em hospedeiros intermediários/acidentais (gado/humano) e definitivos (cães). Estas medidas de controlo têm de ser bem implementadas para se poder evitar a disseminação da parasitose (Eckert e Deplazes, 2004).

Estes programas de controlo deverão incluir educação à população e melhoria das inspecções sanitárias feitas por veterinários além de que se deve estar focado na protecção pessoal dos indivíduos que lidam com material infeccioso (trabalhadores de matadouros, veterinários). Um controlo da população canina é também importante, nomeadamente a correcta desparasitação dos cães, com inceneração das fezes, o seu registo e o controlo das populações errantes. Também se deverá ter em atenção os animais selvagens pois estes podem funcionar como reservatório ou como hospedeiros alternativos para a manutenção do ciclo de vida.

Ao longo dos anos foram implementados diversos programas de controlo como por exemplo na Nova Zelândia, Chipre e em alguns países do continente sul-americano (Gemmell *et al.*, 2001). Estes programas têm como objectivos o controlo da parasitose no hospedeiro definitivo (cão), nos hospedeiros intermediários e nos humanos. Normalmente tratam-se os cães com praziquantel, abrangendo toda a população canina, mas tendo uma especial atenção para os cães que guardam os

CAPÍTULO 1

rebanhos. Em alguns casos também são abatidos cães errantes de forma a conseguir controlar melhor a prevalência durante estes programas. Nos matadouros locais as vísceras eram processadas e as que demonstravam alguma possibilidade de estarem parasitadas eram rejeitadas e acondicionadas adequadamente (Jimenez *et al.*, 2002).

Outra medida importante é a remoção de ungulados mortos dos campos, de forma a impedir os hospedeiros definitivos de se alimentarem com vísceras parasitadas, especialmente de animais com mais idade, pois estes têm maior probabilidade de ter quistos hidáticos e apresentam um maior potencial infeccioso (Torgerson *et al.*, 2009).

A hidatidose provoca directa ou indirectamente perdas anuais na ordem dos milhões de dólares americanos, sendo que estes dados são apenas estimativos (Budke, Deplazes e Torgerson, 2006). Na prática, os efeitos provocados pela parasitose nos animais também levam a uma diminuição da produção de leite, a qual tem um grande impacto na economia, especialmente em comunidades e regiões pobres que dependem maioritariamente da pastorícia (Eckert e Deplazes, 2004). Em conclusão, as medidas de controlo são necessárias e apesar dos custos os resultados serão um bem maior para o futuro (Budke, Deplazes e Torgerson, 2006).

Após a implementação de programas de controlo efectivos, deve ser mantida uma vigilância permanente e outras medidas de controlo necessárias para tal (Gemmell *et al.*, 2001). Mas, existe uma medida de extrema importância e que deve ser mantida que é o controlo sobre a importação de animais, especialmente de cães, e a sua desparasitação, caso contrário a probabilidade da infecção voltar a aumentar é bastante elevada.

1.9. Objectivos

O presente trabalho tem como objectivo geral o estudo do céstode *E. granulosus* em Portugal aos níveis epidemiológico, morfológico e molecular, contribuindo para o conhecimento do mesmo em hospedeiros intermediários.

1.9.1. Objectivos específicos

Os objectivos específicos que foram definidos são os seguintes

1. Estudo morfológico de material biológico (órgãos internos) de animais e humanos parasitados por *E. granulosus*;
2. Identificação e caracterização dos polimorfismos encontrados nos genótipos de *E. granulosus* circulantes em Portugal, fazendo o uso de marcadores moleculares de origem mitocondrial e nuclear;
3. Avaliação das relações filogenéticas existentes entre as estirpes de *E. granulosus* circulantes em Portugal usando os marcadores mitocondriais e os nucleares.

1.10. Referências bibliográficas

- ABBASI, I., BRANZBURG, A., CAMPOS-PONCE, M., ABDEL HAFEZ, S. K.,
RAOUL, F., CRAIG, P. S., & HAMBURGER, J. 2003. Copro-diagnosis of
Echinococcus granulosus infection in dogs by amplification of a newly
identified repeated DNA sequence. *Am J Trop Med Hyg*, 69, 324-330.
- ADWAN, G., ADWAN, K., BDIR, S., & ABUSEIR, S. 2013. Molecular
characterization of *Echinococcus granulosus* isolated from sheep in Palestine.
Exp Parasitol, 134, 195-199.
- ALEHAN, D., CELIKER, A., & AYDINGOZ, U. 1995. Cardiac hydatid cyst in a
child: diagnostic value of echocardiography and magnetic resonance imaging.
Acta Paediatr Jpn, 37, 645-647.
- ALLAN, J. C., CRAIG, P. S., GARCIA NOVAL, J., MENCOS, F., LIU, D.,
WANG, Y., *ET AL.* 1992. Coproantigen detection for immunodiagnosis of
echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology*, 104, 347-356.
- ALVAREZ ROJAS, C. A., ROMIG, T., & LIGHTOWLERS, M. W. 2014.
Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans--review of
current knowledge. *Int J Parasitol*, 44, 9-18.
- ARMUA-FERNANDEZ, M. T., NONAKA, N., SAKURAI, T., NAKAMURA, S.,
GOTTSTEIN, B., DEPLAZES, P., OKU, Y. 2011. Development of PCR/dot
blot assay for specific detection and differentiation of taeniid cestode eggs in
canids. *Parasitol Int*, 60, 84-89.
- BART, J. M., BARDONNET, K., ELFEGOUN, M. C., DUMON, H., DIA, L.,
VUITTON, D. A., & PIARROUX, R. 2004. *Echinococcus granulosus* strain
typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA
fragments. *Parasitology*, 128, 229-234.
- BHATTACHARYA, D., BERA, A. K., BERA, B. C., MAITY, A., & DAS, S. K.
2007. Genotypic characterisation of Indian cattle, buffalo and sheep isolates of
Echinococcus granulosus. *Vet Parasitol*, 143, 371-374.

- BEATO, S.F.A. 2009. Contributo para a caracterização molecular de *Echinococcus granulosus* em Portugal. Tese de Mestrado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa, 113 páginas.
- BOWLES, J., & MCMANUS, D. P. 1993. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol*, 23, 969-972.
- BOWLES, J., & MCMANUS, D. P. 1993. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol*, 57, 231-239.
- BOWLES, J., & MCMANUS, D. P. 1993. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop*, 53, 291-305.
- BOWLES, J., BLAIR, D., & MCMANUS, D. P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*, 54, 165-173.
- BOWLES, J., BLAIR, D., & MCMANUS, D. P. 1994. Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 109, 215-221.
- BOWLES, J., VAN KNAPEN, F., & MCMANUS, D. 1992. Cattle strain of *Echinococcus granulosus* and human infection. *Lancet*, 339, 1358.
- BROWN, R. A., MILLAR, A. J., STEINER, Z., KRIGE, J. E., BURKIMSHER, D., & CYWES, S. 1995. Hydatid cyst of the pancreas - a case report in a child. *Eur J Pediatr Surg*, 5, 121-123.
- BRUNETTI, E., & FILICE, C. 2001. Radiofrequency thermal ablation of echinococcal liver cysts. *Lancet*, 358,1464.
- BRUNETTI, E., & JUNGHANSS, T. 2009. Update on cystic hydatid disease. *Curr Opin Infect Dis*, 22, 497-502.
- BRUNETTI, E., FILICE, C., & SCHANTZ, P. 2002. Safety of percutaneous drainage for liver hydatid cysts. *Can J Surg*, 45, 388.

CAPÍTULO 1

- BRUNETTI, E., GARCIA, H. H., JUNGHANSS, T., & INTERNATIONAL CE WORKSHOP IN LIMA, P. 2011. Cystic echinococcosis: chronic, complex, and still neglected. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1146.
- BRUNETTI, E., KERN, P., VUITTON, D. A., & WRITING PANEL FOR THE, W.-I. 2010. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop*, 114, 1-16.
- BRUNETTI, E., TROIA, G., GARLASCHELLI, A. L., GULIZIA, R., & FILICE, C. 2004. Twenty years of percutaneous treatments for cystic echinococcosis: a preliminary assessment of their use and safety. *Parassitologia*, 46, 367-370.
- BRUŽINSKAITĖ, R., SARKUNAS, M., TORGERSON, P. R., MATHIS, A., & DEPLAZES, P. 2009. Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus spp.* in dogs in southwestern Lithuania. *Vet Parasitol*, 160, 237-241.
- BUDKE, C. M., DEPLAZES, P., & TORGERSON, P. R. 2006. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis*, 12, 296-303.
- BUSI, M., SNABEL, V., VARCASIA, A., GARIPPA, G., PERRONE, V., DE LIBERATO, C., & D'AMELIO, S. 2007. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol*, 150, 75-83.
- CARDONA, G. A., & CARMENA, D. 2013. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol*, 192, 10-32.
- CARMONA, C., PERDOMA, R., CARBO, A., ALVAREZ, C., MONTI, J., GRAUBERT, D., STERN, G., PERERA, G., LLOYD, S., BAZINI, R., GEMMELL, M., YARZABAL, L., 1998. Risk factors associated with human cystic echinococcosis in Florida, Uruguay: results of a mass screening study using ultrasound and serology. *Am J Trop Med Hyg*, 58, 599-605.
- CASTRO A., SILVA M., VELOSO G., FREIRE L., RODRIGUES A., SILVA E., AGANTE A., CONCEIÇÃO M.A.P., CORREIA DA COSTA J.M. 2005. Determination of *Echinococcus granulosus* genotypes with NADH

dehydrogenase 1 and cytochrome c oxidase 1 sequences. *Acta Parasitol Port*, 12, 395–396.

CASULLI, A., INTERISANO, M., SRETER, T., CHITIMIA, L., KIRKOVA, Z., LA ROSA, G., & POZIO, E. 2012. Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infect Genet Evol*, 12, 377-383.

CHRISTOFI, G., DEPLAZES, P., CHRISTOFI, N., TANNER, I., ECONOMIDES, P., & ECKERT, J. 2002. Screening of dogs for *Echinococcus granulosus* coproantigen in a low endemic situation in Cyprus. *Vet Parasitol*, 104, 299-306.

CRAIG, P. S., MACPHERSON, C. N., WATSON-JONES, D. L., & NELSON, G. S. 1988. Immunodetection of *Echinococcus* eggs from naturally infected dogs and from environmental contamination sites in settlements in Turkana, Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82, 268-274.

CRAIG, P. S., MCMANUS, D. P., LIGHTOWLERS, M. W., CHABALGOITY, J. A., GARCIA, H. H., GAVIDIA, C. M., SCHANTZ, P. M. 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis*, 7, 385-394.

CRAIG, P. S., ROGAN, M. T., & CAMPOS-PONCE, M. 2003. Echinococcosis: disease, detection and transmission. *Parasitology*, 127 Suppl, S5-20.

D'ALESSANDRO, A. & RAUSCH, R.L. 2008. New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 380–401.

DAVID DE MORAIS, J.A. 1998. A Hidatidologia Em Portugal. *Ed. Fundação Calouste Gulbenkian*, Lisboa. 334 Páginas.

DAVID DE MORAIS, J.A. 2010. The rise and decline of human hydatid disease in Portugal: historical and epidemiological analysis. *Med Int*, 17, 246-256.

DE LA RUE, M. L., DINKEL, A., MACKENSTEDT, U., & ROMIG, T. 2006. New data on *Echinococcus spp.* in Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 48, 103-104.

CAPÍTULO 1

- DE LA RUE, M. L., TAKANO, K., BROCHADO, J. F., COSTA, C. V., SOARES, A. G., YAMANO, K., TAKAHASHI, K. 2011. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. *Vet Parasitol*, 177, 97-103.
- DEPLAZES, P., ALTHER, P., TANNER, I., THOMPSON, R. C., & ECKERT, J. 1999. *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog, and cat populations. *J Parasitol*, 85, 115-121.
- DEPLAZES, P., GOTTSTEIN, B., ECKERT, J., JENKINS, D. J., EWALD, D., & JIMENEZ-PALACIOS, S. 1992. Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitol Res*, 78, 303-308.
- DEPLAZES, P., VAN KNAPEN, F., SCHWEIGER, A., & OVERGAAUW, P. A. 2011. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Vet Parasitol*, 182, 41-53.
- DIAZ, A., CASARAVILLA, C., IRIGOIN, F., LIN, G., PREVIATO, J. O., & FERREIRA, F. 2011. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol*, 27, 204-213.
- DIAZ, A., CASARAVILLA, C., ALLEN, J. E., SIM, R. B., & FERREIRA, A. M. 2011. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology. *Trends Parasitol*, 27, 264-273.
- DINKEL, A., NJOROGE, E. M., ZIMMERMANN, A., WALZ, M., ZEYHLE, E., ELMAHDI, I. E., ROMIG, T. 2004. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol*, 34, 645-653.
- ECKERT, J., & DEPLAZES, P. 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev*, 17, 107-135.

- ECKERT, J., DEPLAZES, P. & KERN, P. 2011. Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*) and neotropical forms of echinococcosis (*Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*). In Oxford Textbook of Zoonoses: Biology, Clinical Practice, and Public Health Control, 2nd Edn (ed. Palmer, S. R., Soulsby, E. J. L., Torgerson, P. R. and Brown, D. W. G.), pp. 668–699. Oxford University Press, Oxford, UK
- ECKERT, J., THOMPSON, R. C., BUCKLAR, H., BILGER, B., & DEPLAZES, P. 2001. Efficacy evaluation of epsiprantel (Cestex) against *Echinococcus multilocularis* in dogs and cats. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 114, 121-126.
- ECKERT, J., THOMPSON, R. C., MICHAEL, S. A., KUMARATILAKE, L. M., & EL-SAWAH, H. M. 1989. *Echinococcus granulosus* of camel origin: development in dogs and parasite morphology. *Parasitol Res*, 75, 536-544.
- GARGOURI, M., BEN AMOR, N., BEN CHEHIDA, F., HAMMOU, A., GHARBI, H. A., BEN CHEIKH, M., GOLVAN, J. Y. 1990. Percutaneous treatment of hydatid cysts (*Echinococcus granulosus*). *Cardiovasc Intervent Radiol*, 13, 169-173.
- GASSER, R. B., LIGHTOWLERS, M. W., OBENDORF, D. L., JENKINS, D. J., & RICKARD, M. D. 1988. Evaluation of a serological test system for the diagnosis of natural *Echinococcus granulosus* infection in dogs using *E. granulosus* protoscolex and oncosphere antigens. *Aust Vet J*, 65, 369-373.
- GEMMELL, M. A., LAWSON, J. R., & ROBERTS, M. G. 1987. Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: evaluation of the biological parameters of *Taenia hydatigena* and *T. ovis* and comparison with those of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 94, 161-180.
- GEMMELL, M. A., ROBERTS, M. G., BEARD, T. C., & LAWSON, J.R. 2001. Epidemiology: Quantitative epidemiology and transmission dynamics with special reference to *Echinococcus granulosus*. eds. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. *Office Internationales Epizooties*.

CAPÍTULO 1

- GIORGIO, A., TARANTINO, L., DE STEFANO, G., FRANCICA, G., MARINIELLO, N., FARELLA, N., ESPOSITO, F. 2001. Hydatid liver cyst: an 11-year experience of treatment with percutaneous aspiration and ethanol injection. *J Ultrasound Med*, 20, 729-738.
- GRÁCIO, M. A. Hydatid disease in Portugal: Report of human cases and localization of cysts in the body. *Arch Int de la Hidatidosis*, XXXII: 290-291.
- GROSSO, G., GRUTTADAURIA, S., BIONDI, A., MARVENTANO, S., & MISTRETTA, A. 2012. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World J Gastroenterol*, 18, 1425-1437.
- GUERRA, D. R. A. 2012. The sylvatic and synanthropic cycles of *Echinococcus* spp., *Taenia* spp. and *Toxocara* spp. in Portugal: coprologic and molecular diagnosis in canids. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 106 páginas.
- GUERRA, D., ARMUA-FERNANDEZ, M. T., SILVA, M., BRAVO, I., SANTOS, N., DEPLAZES, P., & CARVALHO, L. M. 2013. Taeniid species of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in Portugal with special focus on *Echinococcus* spp. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 2, 50-53.
- HAAG, K. L., ARAUJO, A. M., GOTTSTEIN, B., & ZAHA, A. 1998. Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93, 695-702.
- HAAG, K. L., ARAUJO, A. M., GOTTSTEIN, B., SILES-LUCAS, M., THOMPSON, R. C., & ZAHA, A. 1999. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology*, 118, 63-71.
- HOFER, S., GLOOR, S., MULLER, U., MATHIS, A., HEGGLIN, D., & DEPLAZES, P. 2000. High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, 120, 135-142.
- HOLCMAN, B., & HEATH, D. D. 1997. The early stages of *Echinococcus granulosus* development. *Acta Trop*, 64, 5-17.

- HÜTTNER, M., & ROMIG, T. 2009. *Echinococcus* species in African wildlife. *Parasitology*, 136, 1089-1095.
- HÜTTNER, M., NAKAO, M., WASSERMANN, T., SIEFERT, L., BOOMKER, J. D., DINKEL, A., ITO, A. 2008. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol*, 38, 861-868.
- HÜTTNER, M., SIEFERT, L., MACKENSTEDT, U., & ROMIG, T. 2009. A survey of *Echinococcus* species in wild carnivores and livestock in East Africa. *Int J Parasitol*, 39, 1269-1276.
- JANNOTTI-PASSOS, L. K., SOUZA, C. P., PARRA, J. C., & SIMPSON, A. J. 2001. Biparental mitochondrial DNA inheritance in the parasitic trematode *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*, 87, 79-82.
- JENKINS, D. J., & RICKARD, M. D. 1986. Specificity of scolex and oncosphere antigens for the serological diagnosis of taeniid cestode infections in dogs. *Aust Vet J*, 63, 40-42.
- JIMENEZ, S., PEREZ, A., GIL, H., SCHANTZ, P., RAMALLE, E., & JUSTE, R. 2002. Progress in control of cystic echinococcosis in La Rioja, Spain: decline in infection prevalences in human and animal hosts and economic costs and benefits. *Acta Trop*, 83, 213-221.
- JUNGHANSS, T., DA SILVA, A. M., HORTON, J., CHIODINI, P. L., & BRUNETTI, E. 2008. Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives. *Am J Trop Med Hyg*, 79, 301-311.
- KAMAL, I., ROMIG, T., KERN, P. & RIHAB, A.O. 2011. A molecular survey on cystic echinococcosis in Sinnar area, Blue Nile state (Sudan). *Chinese Med J*, 124, 2829-2833.
- KAMENETZKY, L., GUTIERREZ, A. M., CANOVA, S. G., HAAG, K. L., GUARNERA, E. A., PARRA, A., ROSENZVIT, M. C. 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol*, 2, 129-136.

CAPÍTULO 1

- KAMIYA, M. 2007. Collaborative control initiatives targeting zoonotic agents of alveolar echinococcosis in the northern hemisphere. *J Vet Sci*, 8, 313-321.
- KEDRA, A.H., SWIDERSKI, Z., TKACH, V., DUBINSKI, P., PAWLOWSKI, Z., STEPHANIAK, J., PAWLOWSKI, J. 1999. Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitol* 44:248–254
- KEDRA, A. H., TKACH, V. V., SWIDERSKI, Z., & PAWLOWSKI, Z. 2001. Intraspecific variability among NADH dehydrogenase subunit 1 sequences of *Taenia hydatigena*. *Parasitol Int*, 50, 145-148.
- KNAPP, J., NAKAO, M., YANAGIDA, T., OKAMOTO, M., SAARMA, U., LAVIKAINEN, A., & ITO, A. 2011. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Mol Phylogenet Evol*, 61, 628-638.
- KOHLI, A., GUPTA, R. K., POPTANI, H., & ROY, R. 1995. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy in a case of intracranial hydatid cyst. *Neurology*, 45, 562-564.
- KONYAEV, S.V., YANAGIDA, T., IVANOV, M.V., RUPPEL, V.V., SAKO, Y., NAKAO, M. & ITO, A. 2011 The first report on cystic echinococcosis in a cat caused by *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1). *J Helminthol*, 86, 391-394.
- KUMARATILAKE, L. M., & THOMPSON, R. C. 1982. A review of the taxonomy and speciation of the genus *Echinococcus* Rudolphi 1801. *Z Parasitenkd*, 68, 121-146.
- LARRIEU, E. J., & FRIDER, B. 2001. Human cystic echinococcosis: contributions to the natural history of the disease. *Ann Trop Med Parasitol*, 95, 679-687.
- LAVIKAINEN, A., LEHTINEN, M. J., LAAKSONEN, S., AGREN, E., OKSANEN, A., & MERI, S. 2006. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology*, 133, 565-570.

- LAVIKAINEN, A., LEHTINEN, M. J., MERI, T., HIRVELA-KOSKI, V., & MERI, S. 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 127, 207-215.
- LE, T. H., PEARSON, M. S., BLAIR, D., DAI, N., ZHANG, L. H., & MCMANUS, D. P. 2002. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 124, 97-112.
- LEISTER, D. 2005. Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends Genet*, 21, 655-663.
- MACPHERSON, C.N.L. 2001. Epidemiology of *Echinococcus granulosus* in transhumant situations. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Pawlowski, K. and Meslin F.-X. (eds), WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals, *Office Internationales Epizooties*, pp 156-163.
- MAGISTRELLI, P., MASETTI, R., COPPOLA, R., MESSIA, A., NUZZO, G., & PICCIOCCI, A. 1991. Surgical treatment of hydatid disease of the liver. A 20-year experience. *Arch Surg*, 126, 518-522; discussion 523.
- MARRONE, G., CRINO, F., CARUSO, S., MAMONE, G., CAROLLO, V., MILAZZO, M., GRIDELLI, B. 2012. Multidisciplinary imaging of liver hydatidosis. *World J Gastroenterol*, 18, 1438-1447.
- MATHIS, A., DEPLAZES, P., & ECKERT, J. 1996. An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J Helminthol*, 70, 219-222.
- MATHIS, A., DEPLAZES, P., KOHLER, P., & ECKERT, J. 1996. PCR for detection and characterization of parasites (*Leishmania*, *Echinococcus*, *Microsporidia*, *Giardia*). *Schweiz Arch Tierheilkd*, 138, 133-138.
- MCMANUS, D. P. 2006. Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitol Int*, 55, S31-37.
- MCMANUS, D. P., & THOMPSON, R. C. 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*, 127, S37-51.

CAPÍTULO 1

- MENEZES DA SILVA, A. 2003. Hydatid cyst of the liver-criteria for the selection of appropriate treatment. *Acta Trop*, 85, 237-242.
- MITREA, I. L., IONITA, M., COSTIN, II, PREDOI, G., AVRAM, E., RINALDI, L., GENCHI, C. 2014. Occurrence and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in naturally infected adult sheep and cattle in Romania. *Vet Parasitol*, 206, 159-166.
- MITREA, I. L., IONITA, M., WASSERMANN, M., SOLCAN, G., & ROMIG, T. 2012. Cystic echinococcosis in Romania: an epidemiological survey of livestock demonstrates the persistence of hyperendemicity. *Foodborne Pathog Dis*, 9, 980-985.
- MOGOYE, B. K., MENEZES, C. N., WONG, M. L., STACEY, S., VON DELFT, D., WAHLERS, K., FREAN, J. 2013. First insights into species and genotypes of *Echinococcus* in South Africa. *Vet Parasitol*, 196, 427-432.
- MOKS, E., JOGISALU, I., VALDMANN, H., & SAARMA, U. 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of genotypes G5-G10. *Parasitology*, 135, 647-654.
- MORENO, M., BENAVIDEZ, U., CAROL, H., ROSENKRANZ, C., WELLE, M., CARMONA, C., CHABALGOITY, J. A. 2004. Local and systemic immune responses to *Echinococcus granulosus* in experimentally infected dogs. *Vet Parasitol*, 119, 37-50.
- MORO, P. L., NAKAO, M., ITO, A., SCHANTZ, P. M., CAVERO, C., & CABRERA, L. 2009. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitol Int*, 58, 184-186.
- MWAMBETE, D., K., PONCE-GORDO, F., & CUESTA-BANDERA, C. 2004. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop*, 91, 87-93.
- NAKAO, M., LAVIKAINEN, A., IWAKI, T., HAUKISALMI, V., KONYAEV, S., OKU, Y., ITO, A. 2013. Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck, 1816 and the creation of a new genus *Versteria*. *Int J Parasitol*, 43, 427-437.

- NAKAO, M., MCMANUS, D. P., SCHANTZ, P. M., CRAIG, P. S., & ITO, A. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, 134, 713-722.
- NAKAO, M., SAKO, Y., YOKOYAMA, N., FUKUNAGA, M., & ITO, A. 2000. Mitochondrial genetic code in cestodes. *Mol Biochem Parasitol*, 111, 415-424.
- NAKAO, M., YANAGIDA, T., KONYAEV, S., LAVIKAINEN, A., ODNOKURTSEV, V. A., ZAIKOV, V. A., & ITO, A. 2013. Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology*, 140, 1625-1636.
- NAKAO, M., YOKOYAMA, N., SAKO, Y., FUKUNAGA, M., & ITO, A. 2002. The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidea: Taeniidae). *Mitochondrion*, 1, 497-509.
- OKAMOTO, M., BESSHO, Y., KAMIYA, M., KUROSAWA, T., & HORII, T. 1995. Phylogenetic relationships within *Taenia taeniaeformis* variants and other taeniid cestodes inferred from the nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I gene. *Parasitol Res*, 81, 451-458.
- OMER, R. A., DINKEL, A., ROMIG, T., MACKENSTEDT, U., ELNAHAS, A. A., ARADAIB, I. E., ADAM, A. 2010. A molecular survey of cystic echinococcosis in Sudan. *Vet Parasitol*, 169, 340-346.
- PAREDES, R., GODOY, P., RODRIGUEZ, B., GARCIA, M. P., CABEZON, C., CABRERA, G., GALANTI, N. 2011. Bovine (*Bos taurus*) humoral immune response against *Echinococcus granulosus* and hydatid cyst infertility. *J Cell Biochem*, 112, 189-199.
- PEDNEKAR, R. P., GATNE, M. L., THOMPSON, R. C., & TRAUB, R. J. 2009. Molecular and morphological characterisation of *Echinococcus* from food producing animals in India. *Vet Parasitol*, 165, 58-65.
- PEZESHKI, A., AKHLAGHI, L., SHARBATKHORI, M., RAZMJOU, E., OORMAZDI, H., MOHEBALI, M., & MEAMAR, A. R. 2013. Genotyping of

CAPÍTULO 1

- Echinococcus granulosus* from domestic animals and humans from Ardabil Province, northwest Iran. *J Helminthol*, 87, 387-391.
- PICCOLI, L., BAZZOCCHI, C., BRUNETTI, E., MIHAILESCU, P., BANDI, C., MASTALIER, B., CRETU, C. 2013. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in south-eastern Romania: evidence of G1-G3 and G6-G10 complexes in humans. *Clin Microbiol Infect*, 19, 578-582.
- PLESKER, R., BAUER, C., TACKMANN, K., & DINKEL, A. 2001. Hydatid echinococcosis (*Echinococcus granulosus*) in a laboratory colony of pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 48, 367-372.
- REIS T., VILARES, A., FERREIRA, I., MARTINS, S., FURTADO, C. & GARGATÉ, M. J. 2014. Hidatidose quística humana: análise retrospectiva de casos diagnosticados e em monitorização entre 2008 e 2013. *Observações Boletim Epidemiológico*, 8, 30-33.
- RIGANO, R., BUTTARI, B., DE FALCO, E., PROFUMO, E., ORTONA, E., MARGUTTI, P., SIRACUSANO, A. 2004. *Echinococcus granulosus*-specific T-cell lines derived from patients at various clinical stages of cystic echinococcosis. *Parasite Immunol*, 26, 45-52.
- RIGET, F., DIETZ, R., VORKAMP, K., JOHANSEN, P., & MUIR, D. 2004. Levels and spatial and temporal trends of contaminants in Greenland biota: an updated review. *Sci Total Environ*, 331, 29-52.
- ROBERTS, M. G. 1994. Modelling of parasitic populations: cestodes. *Veterinary Parasitology*, 54, 145-160.
- ROGAN, M. T., HAI, W. Y., RICHARDSON, R., ZEYHLE, E., & CRAIG, P. S. 2006. Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends Parasitol*, 22, 431-438.
- ROJO-VAZQUEZ, F.A., PARDO-LLEDIAS, J., FRANCO-VON HUNEFELD, M., CORDERO-SANCHEZ, M., ALAMO-SANZ, R., ET AL. 2011. Cystic echinococcosis in Spain: current situation and relevance for other endemic areas in Europe. *PLoS Negl Trop Dis*, 5: e893.

- ROMIG, T., DINKEL, A., & MACKENSTEDT, U. 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int*, 55 Suppl, S187-191.
- ROMIG, T., OMER, R. A., ZEYHLE, E., HÜTTNER, M., DINKEL, A., SIEFERT, L., KERN, P. 2011. Echinococcosis in sub-Saharan Africa: emerging complexity. *Vet Parasitol*, 181, 43-47.
- ROSSI, F., IACONELLI, A., FIORENTINI, L., ZITO, F., DONATI, M. B., DE CRISTOFARO, M. L., MINGRONE, G. 2012. Immunological response in egg-sensitive adults challenged with cheese containing or not containing lysozyme. *J Am Coll Nutr*, 31, 385-391.
- ROSTAMI NEJAD, M., TAGHIPOUR, N., NOCHI, Z., NAZEMALHOSSEINI MOJARAD, E., MOHEBBI, S. R., FASIHI HARANDI, M., *et al.* 2012. Molecular identification of animal isolates of *Echinococcus granulosus* from Iran using four mitochondrial genes. *J Helminthol*, 86, 485-492.
- SAARMA, U., JOGISALU, I., MOKS, E., VARCASIA, A., LAVIKAINEN, A., OKSANEN, A., MARAVILLA, P. 2009. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology*, 136, 317-328.
- SAGE, A. M., WACHIRA, T. M., ZEYHLE, E. E., WEBER, E. P., NJOROGE, E., & SMITH, G. 1998. Evaluation of diagnostic ultrasound as a mass screening technique for the detection of hydatid cysts in the liver and lung of sheep and goats. *Int J Parasitol*, 28, 349-353.
- SANCHEZ, E., CACERES, O., NAQUIRA, C., MIRANDA, E., SAMUDIO, F., & FERNANDES, O. 2012. *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from an endemic region in Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107, 275-278.
- SAREMI, F., & MCNAMARA, T. O. 1995. Hydatid cysts of the liver: long-term results of percutaneous treatment using a cutting instrument. *AJR Am J Roentgenol*, 165, 1163-1167.
- SAYEK, I., & ONAT, D. 2001. Diagnosis and treatment of uncomplicated hydatid cyst of the liver. *World J Surg*, 25, 21-27.

CAPÍTULO 1

- SCHANTZ, P.M., CHAI, J., CRAIG, P.S., ECKERT, J., JENKINS, D.J., MACPHERSON, C.N.L. AND THAKUR, A. 1995. Epidemiology and control of hydatid. In: *Echinococcus* and Hydatid disease, eds. Thompson, R.C.A. and Lymbery, A.L. *CAB International, Wallingford*, pp. 233-331.
- SCHIPPER, H. G., LAMERIS, J. S., VAN DELDEN, O. M., RAUWS, E. A., & KAGER, P. A. 2002. Percutaneous evacuation (PEVAC) of multivesicular echinococcal cysts with or without cystobiliary fistulas which contain non-drainable material: first results of a modified PAIR method. *Gut*, 50, 718-723.
- SCHNEIDER, R., GOLLACKNER, B., SCHINDL, M., TUCEK, G., & AUER, H. 2010. *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria. *Am J Trop Med Hyg*, 82, 871-874.
- SCOTT, J. C., STEFANIAK, J., PAWLOWSKI, Z. S., & MCMANUS, D. P. 1997. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 114, 37-43.
- SHARIFIYAZDI, H., ORYAN, A., AHMADNIA, S. & VALINEZHAD, A. 2011. Genotypic characterization of iranian camel (*Camelus dromedarius*) isolates of *Echinococcus granulosus*. *J Parasitol*, 97, 251–255.
- SHARMA, M., FOMDA, B. A., MAZTA, S., SEHGAL, R., SINGH, B. B., & MALLA, N. 2013. Genetic diversity and population genetic structure analysis of *Echinococcus granulosus sensu stricto* complex based on mitochondrial DNA signature. *PLoS One*, 8, e82904.
- SHARMA, M., SEHGAL, R., FOMDA, B. A., MALHOTRA, A., & MALLA, N. 2013. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* cysts in north Indian patients: identification of G1, G3, G5 and G6 genotypes. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2262.
- SIMSEK, S., KAPLAN, M., & OZERCAN, I. H. 2011. A comprehensive molecular survey of *Echinococcus granulosus* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues in human isolates in Turkey. *Parasitol Res*, 109, 411-416.

- SIRACUSANO, A., DELUNARDO, F., TEGGI, A., & ORTONA, E. 2012. Cystic echinococcosis: aspects of immune response, immunopathogenesis and immune evasion from the human host. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 12, 16-23.
- SNABEL, V., ALTINTAS, N., D'AMELIO, S., NAKAO, M., ROMIG, T., YOLASIGMAZ, A., DUBINSKY, P. 2009. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol Res*, 105, 145-154.
- SORIANO, S. V., PIERANGELI, N. B., PIANCIOLA, L., MAZZEO, M., LAZZARINI, L. E., SAIZ, M. S., BASUALDO, J. A. 2010. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquen, Patagonia Argentina. *Parasitol Int*, 59, 626-628.
- STEFANIC, S., SHAIKENOV, B. S., DEPLAZES, P., DINKEL, A., TORGERSON, P. R., & MATHIS, A. 2004. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep strain") in naturally infected dogs. *Parasitol Res*, 92, 347-351.
- TAPPE, D., KERN, P., FROSCH, M. & KERN, P. 2010. A hundred years of controversy about the status of *Echinococcus* species. *Acta Tropica*, 115, 167-174.
- THOMPSON, R. C. 2008. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*, 119, 439-446.
- THOMPSON, R. C., & LYMBERY, A. J. 1988. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol*, 27, 209-258.
- THOMPSON, R. C., & MCMANUS, D. P. 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*, 18, 452-457.
- THOMPSON, R. C., BOXELL, A. C., RALSTON, B. J., CONSTANTINE, C. C., HOBBS, R. P., SHURY, T., & OLSON, M. E. 2006. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. *Parasitology*, 132, 439-447.

CAPÍTULO 1

- THOMPSON, R. C., NICHOLAS, W. L., HOWELL, M. J., & KUMARATILAKE, L. M. 1985. *Echinococcus granulosus* in a fox. *Aust Vet J*, 62, 200-201.
- TORGERSON, P. R. 2006. Canid immunity to *Echinococcus spp.*: impact on transmission. *Parasite Immunol*, 28, 295-303.
- TORGERSON, P. R., & BUDKE, C. M. 2003. Echinococcosis-an international public health challenge. *Res Vet Sci*, 74, 191-202.
- TORGERSON, P. R., & DEPLAZES, P. 2009. Echinococcosis: diagnosis and diagnostic interpretation in population studies. *Trends Parasitol*, 25, 164-170.
- TORGERSON, P. R., & HEATH, D. D. 2003. Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 127 Suppl, S143-158.
- TORGERSON, P. R., WILLIAMS, D. H., & ABO-SHEHADA, M. N. 1998. Modelling the prevalence of *Echinococcus* and *Taenia* species in small ruminants of different ages in northern Jordan. *Vet Parasitol*, 79, 35-51.
- TORGERSON, P. R., ZIADINOV, I., AKNAZAROV, D., NURGAZIEV, R., & DEPLAZES, P. 2009. Modelling the age variation of larval protoscoleces of *Echinococcus granulosus* in sheep. *Int J Parasitol*, 39, 1031-1035.
- TRACHSEL, D., DEPLAZES, P., & MATHIS, A. 2007. Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology*, 134, 911-920.
- TRINCA, A.A.T.C. 2001. Contribuição para o imunodiagnóstico da Hidatidose. Dissertação para acesso à categoria de Investigador Auxiliar. IHMT – Universidade Nova De Lisboa. 134 Páginas.
- UMHANG, G., WORONOFF-RHEN, N., COMBES, B., & BOUE, F. 2011. Segmental sedimentation and counting technique (SSCT): an adaptable method for qualitative diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Exp Parasitol*, 128, 57-60.
- VARCASIA, A., CANU, S., KOGKOS, A., PIPIA, A. P., SCALA, A., GARIPPA, G., & SEIMENIS, A. 2007. Molecular characterization of *Echinococcus*

- granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitol Res*, 101, 1135-1139.
- VARCASIA, A., GARIPPA, G., PIPIA, A. P., SCALA, A., BRIANTI, E., GIANNETTO, S., MICAGNI, G. 2008. Cystic echinococcosis in equids in Italy. *Parasitol Res*, 102, 815-818.
- VILLALOBOS, N., GONZALEZ, L. M., MORALES, J., DE ALUJA, A. S., JIMENEZ, M. I., BLANCO, M. A., GARATE, T. 2007. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. *Vet Parasitol*, 147, 185-189.
- VUITTON, D. A., WANG, Q., ZHOU, H. X., RAOUL, F., KNAPP, J., BRESSON-HADNI, S., GIRAUDOUX, P. 2011. A historical view of alveolar echinococcosis, 160 years after the discovery of the first case in humans: part 1. What have we learnt on the distribution of the disease and on its parasitic agent? *Chin Med J*, 124, 2943-2953.
- VURAL, G., BACA, A. U., GAUCI, C. G., BAGCI, O., GICIK, Y., & LIGHTOWLERS, M. W. 2008. Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol*, 154, 347-350.
- WACHIRA, T. M., MACPHERSON, C. N., & GATHUMA, J. M. 1991. Release and survival of *Echinococcus* eggs in different environments in Turkana, and their possible impact on the incidence of hydatidosis in man and livestock. *J Helminthol*, 65, 55-61.
- WEN, H., NEW, R. R., & CRAIG, P. S. 1993. Diagnosis and treatment of human hydatidosis. *Br J Clin Pharmacol*, 35, 565-574.
- XIAO, N., QIU, J., NAKAO, M., LI, T., YANG, W., CHEN, X., ITO, A. 2006. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: discovery and epidemiological implications. *Parasitol Int*, 55 Suppl, S233-236.

CAPÍTULO 1

- XIAO, N., QIU, J., NAKAO, M., LI, T., YANG, W., CHEN, X., ITO, A. 2005. *Echinococcus shiquicus sp.*, a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol*, 35, 693-701.
- YANAGIDA, T., MOHAMMADZADEH, T., KAMHAWI, S., NAKAO, M., SADJJADI, S. M., HIJJAWI, N., ITO, A. 2012. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East. *Parasitol Int*, 61, 599-603.
- ZHANG, W., LI, J., YOU, H., ZHANG, Z., TURSON, G., LOUKAS, A., & MCMANUS, D. P. 2003. A gene family from *Echinococcus granulosus* differentially expressed in mature adult worms. *Mol Biochem Parasitol*, 126, 25-33.
- ZHANG, W., ROSS, A. G., & MCMANUS, D. P. 2008. Mechanisms of immunity in hydatid disease: implications for vaccine development. *J Immunol*, 181, 6679-6685.
- ZIADINOV, I., MATHIS, A., TRACHSEL, D., RYSMUKHAMBETOVA, A., ABDYJAPAROV, T. A., KUTTUBAEV, O. T., TORGERSON, P. R. 2008. Canine echinococcosis in Kyrgyzstan: using prevalence data adjusted for measurement error to develop transmission dynamics models. *Int J Parasitol*, 38, 1179-1190.

RESULTADOS

CAPÍTULO 2

Epidemiologia do quisto hidático e sua fertilidade em Portugal

2.1. Introdução

A hidatidose apresenta uma distribuição cosmopolita e encontra-se entre as zoonoses de maior importância a nível mundial. O parasita *Echinococcus granulosus*, responsável por esta doença, apresenta um ciclo de vida heterogéneo cuja forma adulta se encontra presente em cães ou outros canídeos (hospedeiros definitivos) e a forma larvar (hidátide) pode ser encontrada em numerosas espécies de herbívoros ou omnívoros (hospedeiros intermediários) incluindo, entre outros, ovinos, bovinos, camelos e porcos (Vural *et al.*, 2008). Os humanos surgem como hospedeiros acidentais. (McManus e Thompson, 2003).

A espécie *E. granulosus* apresenta um elevado nível de variação intra-específica, sendo que algumas variantes genéticas (genótipos) têm sido descritas como estando adaptadas a diferentes hospedeiros intermediários. Estes genótipos apresentam diferentes características no que diz respeito às patologias que causam, às suas características bioquímicas, fisiológicas, antigénicas e genéticas, assim como à sua infecciosidade diferencial para com os humanos (Dinkel *et al.*, 2004), ao padrão do ciclo de vida, à dinâmica de transmissão e à sensibilidade a agentes quimioterapêuticos (McManus e Thompson, 2003 e Manterola *et al.*, 2008). Todos estes aspectos têm implicações significativas no desenho e desenvolvimento de vacinas, técnicas de diagnóstico e esquemas terapêuticos, e apresentam grande impacto na epidemiologia e controlo da hidatidose (Manterola *et al.*, 2008).

Como consequência da grande diversidade genética, tendo por base a análise das sequências nucleotídicas de diversos marcadores mitocondriais, foram descritos 10 genótipos (G1 a G10) para *E. granulosus* (Nakao *et al.*, 2007). Alguns genótipos foram recentemente propostos para merecer o estatuto de espécie, nomeadamente os genótipos G1-G3, associados à espécie *E. granulosus sensu stricto*, G4 (*E. equinus*), G5 (*E. ortleppi*) e G6-G10 (*E. canadensis*), havendo sido também sugerido um *taxon* independente, o *E. felidis* (Šnábel *et al.*, 2009; Simsek *et al.*, 2010), encontrado em África, não tendo sido estudadas as suas características morfológicas ou incluído, até hoje, em nenhum genótipo. O *E. granulosus s.s.* é um complexo de três genótipos intimamente relacionados, o G1-G3. A estirpe da ovelha comum (G1) é conhecida com sendo altamente infecciosa para os humanos, sendo as estirpes agrupadas como G2, correspondentes à linhagem da ovelha da Tasmânia (G2). Por seu turno, G3

corresponde à linhagem genética de *E. granulosus* encontrada em búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*), no Sul de Itália, usados para a produção de leite que origina um dos queijos típicos da região (Rinaldi *et al.*, 2008; Soriano *et al.*, 2010). Por outro lado, foi demonstrado que a variabilidade genética dentro das estirpes está presente, principalmente no genótipo G1.

Em Portugal, desde o século XIX que têm sido descritos casos de hidatidose (David Morais, 1998) e realizados alguns estudos de cariz imunológico e epidemiológico. A nível genético pouco se conhece sobre as estirpes de *E. granulosus* circulantes em Portugal, apesar de existirem já alguns estudos publicados, tanto centrados em hospedeiros definitivos como também nos intermediários (Cardoso *et al.*, 2014, Mateus *et al.*, 2014, Beato *et al.*, 2013, Guerra *et al.*, 2013, Beato *et al.*, 2010).

Portugal continua a ser considerado pela OMS como endémico, com algumas zonas de hiperendemicidade para a hidatidose, sendo importante conhecer a nível epidemiológico a situação no país em relação ao *E. granulosus* em hospedeiros intermediários.

Os principais objectivos deste estudo são identificar o órgão parasitado e a fertilidade dos quistos, avaliando a presença ou ausência de protoescólices nos mesmos.

2.2. Materiais e métodos

Foram obtidas 210 amostras (tabela 1) de material biológico que os veterinários das inspecções sanitárias suspeitavam ter lesões de quisto hidático. Estas amostras eram provenientes de diferentes matadouros nacionais (Alcains, Guarda, Sousel e Pedrogão Grande), situados na região centro do país e norte do Alentejo, e que recebem animais de todas as regiões nacionais. Foi ainda obtida uma amostra de quisto hidático de rim, proveniente de um hospital da zona centro de Portugal. No total, o estudo recaiu sobre 211 amostras de quisto hidático de diferentes hospedeiros, órgãos e idades.

Foram, ainda usadas no presente trabalho, três amostras de DNA de fígado de búfalo provenientes de Itália e duas amostras de fígado de ovino provenientes do Brasil.

CAPÍTULO 2

2.2.1. Recolha das amostras

O material biológico foi recolhido sob as condições de assepsia que os matadouros permitiam e transportado (refrigerado) para o laboratório, onde foram ou guardadas a -20°C ou processadas de imediato.

2.2.2. Trabalho laboratorial

As amostras foram trabalhadas sob condições de assepsia, sendo extraídos das hidátides, o líquido e a areia hidáticos. A areia hidática foi lavada com soro fisiológico e, após remoção da maioria dos restos de membranas foram observadas todas as amostras ao microscópio para se determinar a fertilidade dos quistos. Após esta determinação as amostras foram divididas por *eppendorfs* de 2ml e guardadas em etanol absoluto a -20°C até posterior continuação do trabalho.

A fertilidade dos quistos hidáticos foi determinada com base na observação ao microscópio ótico do líquido hidático dos mesmos. A presença de areia hidática, protoscólicas no líquido hidático, nos quistos indicava que o mesmo era fértil. A ausência desta areia hidática implicava a infertilidade dos mesmos quistos.

2.2.3. Trabalho estatístico

O Software utilizado foi o SPSS 17.0, o qual serviu para a criação da base de dados contendo toda a informação sobre as variáveis.

Para avaliar os parâmetros apurados, foi realizada a análise estatística com o teste do χ^2 e o cálculo dos limites de confiança a 95%, com a determinação dos graus de liberdade de forma a estimar as categorias independentes na amostra. O teste do χ^2 foi o utilizado por se tratar da análise de variáveis nominais (categóricas), e como tal recorreu-se à utilização deste teste não-paramétrico. Este serve para averiguar se as variáveis são independentes: H_0 : as variáveis são independentes *vs.* H_1 : as variáveis são dependentes. O valor de $p > 0,05$ foi considerado estatisticamente não significativo para todos os casos.

2.3. Resultados

Foram analisados um total de 211 amostras de quistos hidáticos. As amostras foram obtidas a partir do fígado, pâncreas, rim e pulmão de diversos hospedeiros intermediários como ovinos, bovinos e caprinos e, também, de humanos.

A distribuição da origem amostras associando o hospedeiro e o órgão parasitado encontra-se descrita na tabela 1:

Tabela 1. Distribuição das amostras consoante a espécie e o órgão

		Hospedeiro				Total
		Ovino	Bovino	Caprino	Humano	
Órgão	Pulmão	71 (33,6%)	24 (11,4%)	0	0	95 (45,0%)
	Fígado	87 (41,2%)	8 (3,8%)	3 (1,4%)	0	98 (46,4%)
	Pâncreas	17 (8,1%)	0	0	0	17 (8,1%)
	Rim	0	0	0	1 (0,5%)	1 (0,5%)
Total		175 (82,9%)	32 (15,2%)	3 (1,4%)	1 (0,5%)	211 100%

Cerca de 83% das amostras foram obtidas de ovinos, sendo esta percentagem, na sua maioria, dividida entre o fígado e o pulmão, tendo sido ainda encontradas 17 amostras (8,1%) no pâncreas destes animais. As restantes amostras foram obtidas de bovinos, caprinos e uma amostra humana, perfazendo um total de 211 amostras em estudo (Tabela 1). Os ovinos são o hospedeiro animal que apresenta maior número de quistos recolhidos daí que seria de esperar que apresentassem uma maior percentagem de quistos obtidos por órgão.

Na tabela 2 indica-se o número de quistos férteis presentes no pulmão, fígado, pâncreas e rim, de cada espécie.

CAPÍTULO 2

Tabela 2. Distribuição das amostras consoante o hospedeiro, o órgão e a quantidade de quistos férteis

		Hospedeiro				Total
		Ovino	Bovino	Caprino	Humano	
Quistos Férteis	Pulmão	15 (19,7%)	9 (11,8%)	0	0	24 (31,6%)
	Fígado	43 (56,6%)	3 (3,9%)	0	0	46 (60,5%)
	Pâncreas	5 (6,6%)	0	0	0	5 (6,6%)
	Rim	0	0	0	1 (1,3%)	1 (1,3%)
Total		63 (82,9%)	12 (15,8%)	0	1 (1,3%)	76 100%

Em relação à fertilidade dos quistos, os ovinos apresentaram 15 (19,7%) quistos férteis no pulmão, 43 (56,6%) no fígado e ainda 5 (6,6%) quistos férteis obtidos a partir do pâncreas, enquanto os bovinos apresentaram 9 (11,8%) e 3 (3,9%) quistos férteis no pulmão e no fígado respectivamente. Quanto aos caprinos, não apresentaram quistos férteis. O único quisto obtido de um humano foi no rim e era fértil. Verificou-se que maioritariamente as amostras férteis obtidas eram provenientes de fígado de ovino, sendo esta também a espécie de onde se obtiveram maior número de amostras, na generalidade.

Quanto à idade dos animais podemos referir que há uma elevada discrepância entre a mesma, havendo valores desde 3 meses, no caso dos caprinos, até 18 anos, no caso dos bovinos, sendo que a maior parte dos ovinos apresentavam cerca de 12 meses de idade aquando do abate.

Para uma melhor compreensão da importância destes dados a nível estatístico foram levantadas algumas hipóteses estatísticas que foram estudadas e das quais se apresentam os resultados.

Foi colocada uma hipótese estatística de que a fertilidade dos quistos estaria relacionada com o hospedeiro parasitado. Os resultados da associação entre o hospedeiro animal e a fertilidade dos quistos encontram-se descritos na tabela 3, revelando que cerca de 30% dos quistos de ovino eram férteis contra cerca de 6% de quistos hidáticos de bovinos férteis.

Tabela 3. Distribuição das amostras férteis, inférteis e calcificadas, por hospedeiro

	Hospedeiro				Total
	Ovino	Bovino	Caprino	Humano	
Fértil	63 (29,8%)	12 (5,7%)	0	1 (0,5%)	76 (36,0%)
Infértil	19 (9,0%)	5 (2,4%)	3 (1,4%)	0	27 (12,8%)
Calcificadas	85 (40,3%)	15 (7,1%)	0	0	100 (47,4%)
Contaminadas	8 (3,8%)	0	0	0	8 (3,8%)
Total	175 82,9%	32 15,2%	3 1,4%	1 0,5%	211 100,0%

Quanto à fertilidade, as amostras podem ser classificadas em férteis ou inférteis, sendo também importante referir as amostras calcificadas (Figura 1). Houve contaminação bacteriana de algumas amostras, levando a pensar que as condições de colheita ou de armazenamento não tinham a assepsia necessária.

**Figura 1.** Pulmão de ovino evidenciando um quisto hidático calcificado

Do total das 211 amostras, 36,0% (76) eram amostras férteis, 12,8% (27) amostras inférteis e 47,4% (100) amostras encontravam-se calcificadas. Houve ainda a contaminação bacteriana de 3,8% (8) amostras, que foram incineradas.

Tendo em conta apenas as amostras férteis, 29,8% (63) correspondem a ovinos e 5,7% (12) a bovinos, o que seria expectável pois o número de amostras obtidas de ovinos também foi consideravelmente superior ao de bovinos. Das amostras inférteis, 9,0% (19) foram colhidas de ovinos, 12,4% (5) de bovinos e 1,4% (3) de caprinos. Nenhuma das amostras de caprinos era fértil pois estes eram animais muito jovens, não tendo ainda sido possível o desenvolvimento de protoescólices

CAPÍTULO 2

dentro dos quistos. Apenas foi possível obter uma amostra de humanos (0,5%) que era fértil e proveniente de um quisto renal.

Os caprinos não apresentaram amostras calcificadas, ao contrário do que se verificou para os ovinos e os bovinos, que apresentaram 40,3% (85) e 7,1% (15) de amostras calcificadas, respectivamente.

Em todos os aspectos encontramos maiores percentagens nos ovinos que nas outras espécies estudadas, mas também é necessário notar que quase 83% das amostras utilizadas neste estudo são provenientes de ovinos.

Aceita-se a hipótese H_1 , pois foi encontrada associação entre a espécie e a fertilidade do quisto, valor de $p < 0,05$ (tabela 4).

Tabela 4. Associação entre a fertilidade dos quistos e a variável hospedeiro animal

Hipóteses	X ² Valor (d.f.)	p valor
H_0 : A Fertilidade dos quistos não está relacionada com o hospedeiro animal	29,963 (12)	0,003
H_1 : A Fertilidade dos quistos está relacionada com o hospedeiro animal		

Havendo uma relação entre as amostras férteis e o hospedeiro animal parasitado, foi elaborada uma nova hipótese estatística na qual se procurava relacionar a fertilidade dos quistos com o órgão de onde os mesmos eram recolhidos. Na tabela 5 estabelece-se a ligação entre a localização do quisto no hospedeiro e a fertilidade/calcificação dos quistos analisados. As oito amostras contaminadas no decorrer da análise dos quistos hidáticos, não foram consideradas para esta análise estatística.

Tabela 5. Distribuição dos quistos férteis, inférteis e calcificados, por órgão parasitado

		Órgão				Total
		Pulmão	Fígado	Pâncreas	Rim	
Classificação	Fértil	24 11,8%	46 22,7%	5 2,5%	1 0,5%	76 37,4%
	Infértil	8 3,9%	19 9,4%	0	0	27 13,3%
	Calcificados	61 30,0%	27 13,3%	12 5,9%	0	100 49,3%
Total		93 45,8%	92 45,3%	17 8,4%	1 0,5%	203 100,0%

CAPÍTULO 2

Após exclusão das 8 amostras contaminadas ficaram 203 quistos hidáticos que foram tidos em consideração para esta análise, 45,8% (93) foram obtidos a partir do pulmão, 45,3% (92) do fígado, 8,4% do pâncreas e 0,5% do rim, demonstrando que o número de amostras obtidas do fígado e pulmão está bastante equiparada, quando analisados os números absolutos.

Visando os quistos obtidos a partir do pulmão, 11,8% (24) são férteis, 3,9% (8) são inférteis e 30,0% (61) são calcificados, revelando que a percentagem de quistos férteis no pulmão é bastante inferior à de quistos calcificados, ~12% e 30%, respectivamente.

Os quistos extraídos a partir do fígado foram 22,7% (46) férteis, 9,4% (19) inférteis e 13,3% (27) calcificados, demonstrando que quase um quarto das amostras obtidas provinha do fígado dos hospedeiros, e eram férteis, havendo apenas uma pequena percentagem de quistos inférteis.

Ao analisar estes dados denota-se um número de amostras provenientes de fígado e de pulmão muito semelhantes em número absoluto, mas quando se analisam as condições de fertilidade, e consequente capacidade infecciosa para os hospedeiros, verifica-se que há um maior número de amostras férteis (maior capacidade de infecciosidade) com localização no fígado que nos outros órgãos.

Relativamente à hipótese a provar, a associação entre a localização dos quistos e sua fertilidade, ela foi verificada ($p < 0,05$). Assim sendo, aceita-se a hipótese H_1 (tabela 6), demonstrando que o órgão onde se encontram maior número de quistos férteis é o fígado, um dos maiores órgãos do nosso organismo e rico em redes de capilares sanguíneos, necessários para a alimentação e crescimento do metacéstode.

Tabela 6. Associação entre a fertilidade dos quistos e a variável órgão

Hipóteses	X ² Valor (d.f.)	p valor
H ₀ : Fertilidade dos quistos não está relacionada com o órgão parasitado; H ₁ : Fertilidade dos quistos está relacionada com o órgão parasitado.	35,236 (9)	0,007

2.3.1. Distribuição geográfica das amostras obtidas

As amostras biológicas analisadas (sob a forma de quistos hidáticos) foram recolhidas entre Outubro de 2007 e Maio de 2011 em matadouros nas regiões Centro e Alentejo de Portugal continental (figura 2). Das amostras recolhidas há claramente um predomínio de distribuição pela região Alentejana, como apresentado na tabela 7, facto que tem sido referenciado por vários autores, sendo esta zona considerada endémica para *E. granulosus* (David Morais, 1998).

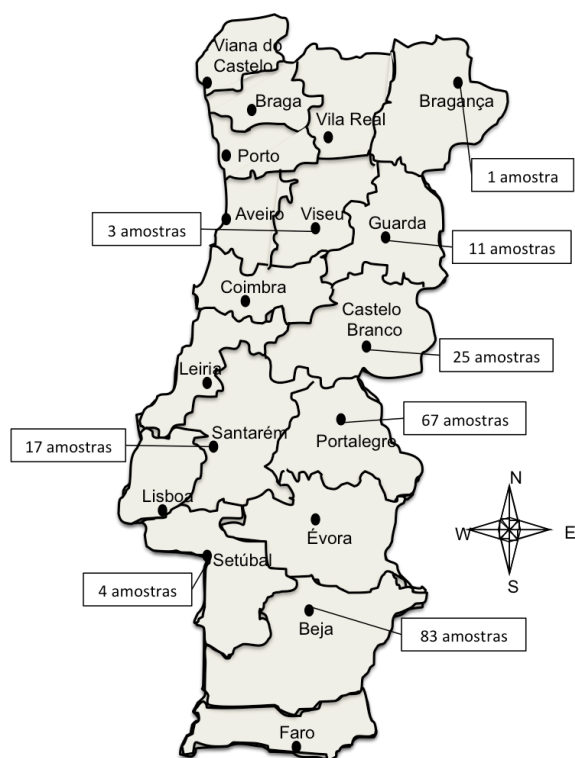


Figura 2 - Distribuição geográfica, por distrito, das amostras de *Echinococcus granulosus* recolhidas entre 2007 e 2011

Tabela 7. Distribuição geográfica das amostras recolhidas entre 2007 e 2011

Zonas geográficas	Norte ¹	Centro ²	Lisboa e Vale do Tejo ³	Alentejo ⁴	Algarve	Total
Número de Amostras	1 (0,5%)	39 (18,5%)	21 (9,9%)	150 (71,1%)	0	211

¹ Distritos de Braga, Bragança, Porto, Viana do Castelo e Vila Real; ² Distritos de Aveiro, Castelo Branco, Coimbra, Guarda, Leiria e Viseu; ³ Distritos de Santarém e Lisboa; ⁴ Distritos de Beja, Évora, Portalegre e Setúbal

Os dados obtidos no presente estudo indicam-nos que a zona do Alentejo continua a ser a zona onde existe o maior predomínio do quisto hidático em Portugal,

com aproximadamente 71% do total de amostras obtidas neste estudo, enquanto na zona do Algarve, nos locais de colheita das nossas amostras, não se encontrou nenhuma amostra parasitada com o *E. granulosus* e na região Norte de Portugal apenas uma amostra revelou ser quisto hidático.

2.4. Discussão

A hidatidose, uma das mais importantes parasitoses provocadas por helmintas no Homem, apresenta algumas lacunas no campo dos estudos epidemiológicos, sendo difícil estabelecer uma prevalência precisa nos hospedeiros intermediários dos diferentes países onde esta está documentada (Njoroge *et al.*, 2002). Esta doença apresenta uma distribuição geográfica à escala mundial, especialmente em regiões onde os habitantes vivem em condições sanitárias precárias e próximo de animais, sendo a Bacia Mediterrânica uma área em que esta parasitose assume maior relevância (McManus *et al.*, 2003).

Portugal encontra-se entre os países considerados pela OMS como endémico, com uma incidência nacional estimada em 2,2 casos/100.000 habitantes (McManus *et al.*, 2003, Gemmell *et al.*, 2001). No entanto, há estudos que indicam que este quadro epidemiológico tem maior importância na região do Alentejo. No presente estudo, de facto foi confirmado que a zona com maior amostragem é o Alentejo, composto pelos distritos de Portalegre, Évora e Beja, como demonstrado na figura 2, vindo a confirmar os estudos realizados no século passado onde esta era, epidemiologicamente, a zona mais afectada pela hidatidose (David Morais, 2010, 2007). No entanto, este facto pode dever-se a um viés associado à origem geográfica da maioria dos quistos hidáticos analisados (Beiras e Alentejo), tendo-se tido acesso restrito a amostras provenientes do Norte de Portugal. Assim, seria necessário o acesso a amostras provenientes de outras zonas geográficas de Portugal para se poder retirar com certeza esta conclusão. Não obstante, e tal como David Morais defendeu em 1998, a região considerada hiperendémica para *E. granulosus* era o Alentejo e na actualidade continua a ser a região mais prevalente para o parasita.

Quanto à fertilidade, as amostras podem ser classificadas em férteis ou inférteis, sendo também importante referir as amostras calcificadas pois significa que

CAPÍTULO 2

houve uma resposta imunitária do hospedeiro que impediu a permanência do parasita vivo dentro do quisto.

No que diz respeito à análise da fertilidade dos quistos encontrados e distribuição por diferentes órgãos, os resultados obtidos estão de acordo com o observado por Ponce-Gordo (1995), isto é, os quistos férteis em bovinos são mais comuns no pulmão, enquanto em ovinos estão habitual e maioritariamente localizados no fígado. Os resultados estão também de acordo com a informação veiculada noutras publicações, no que se refere ao haver maior número de pequenos ruminantes (ovinos) infectados por *E. granulosus* do que bovinos (Abusheewa *et al.*, 2010, Ponce-Gordo, 1995). Em Portugal, pode-se tentar explicar este facto invocando uma maior existência de ovinos, os quais ainda continuam em regime extensivo de crescimento (David Morais, 1998), alimentando-se do que encontram no campo, campo esse onde podem existir os ovos de *E. granulosus*. Por seu turno, os bovinos, mesmo que se encontrem em regime extensivo de crescimento, demoram mais anos a desenvolver-se e são abatidos numa idade mais avançada, sendo que muitos dos seus quistos hidáticos já se encontram calcificados, logo não são úteis para o presente estudo.

É importante evidenciar que apenas 1,4% do total de amostras de quistos hidáticos foram obtidas na espécie caprina, estando estes presentes no fígado, sendo esta espécie descrita na literatura (Ponce Gordo, 1995) como a mais selectiva nos locais onde se alimenta e na forma como se alimenta. Esta espécie tem uma maior tendência para se alimentar de pequenos arbustos e folhas pendentes, sendo estes locais menos prováveis de estarem contaminados com ovos de *E. granulosus*, provenientes das fezes dos hospedeiros definitivos que possam circular pelos campos.

Tendo em conta apenas as amostras férteis, quase 30% correspondem a ovinos e cerca de 6% a bovinos, estes dados estão de acordo com os relatórios da OMS, onde é referido que as amostras em ovinos são, em percentagem, mais férteis que as de bovinos (Gemmell *et al.*, 2001). Das amostras inférteis, quase 20% foram colhidas de ovinos, pois esta foi a espécie de hospedeiro com maior peso amostral, logo seria normal que houvesse uma maior probabilidade deste facto ocorrer. Nenhuma das amostras de caprinos era fértil pois estes eram animais muito jovens,

CAPÍTULO 2

não tendo por isso ainda existido o desenvolvimento de protoescólices dentro dos quistos.

Quanto à fertilidade por órgão parasitado, os resultados obtidos são apoiados pelo estudo de Ibrahim (2009) em que os quistos hepáticos de ovinos apresentavam maior número de quistos férteis em relação aos pulmonares e cujas taxas de fertilidade de quistos hepáticos de camelos, bovinos, ovinos e caprinos foram maiores do que as pulmonares. Tal facto pode dever-se à estreita relação entre o cão, ovino e homem, que torna possível a finalização do ciclo de vida do parasita (Berhe, 2009).

Quanto à espécie bovina, a maioria dos quistos era pulmonar estando de acordo com a bibliografia que indica que a maioria dos quistos hidáticos bovinos são pulmonares enquanto nos ovinos são hepáticos (Al-Yaman, 1985). Deve ser destacada a alta incidência de quistos observada no pulmão, no entanto o número de quistos férteis é baixo (Ponce Gordo, 1995). Em contrapartida, a taxa de fertilidade de quistos hepáticos foi menor do que a pulmonar em bovinos, o que é apoiado pelos resultados obtidos no presente estudo (Ibrahim, 2009).

A localização de quistos no pâncreas não é muito comum. Efectivamente, a literatura relata uma incidência entre 0,1% e 2% de todos os quistos hidáticos em humanos (Krige *et al.*, 2005), não havendo descrição de percentagens de incidência dos mesmos em animais. Sendo o pâncreas um órgão ricamente irrigado pelo sistema sanguíneo será perfeitamente normal que os ovos circulantes na rede arterial e venosa do hospedeiro por aqui passem e, caso sejam de maior tamanho que o calibre dos vasos sanguíneos onde viajam possam ficar aí retidos e se possam vir a desenvolver, apesar dos poucos casos humanos descritos como tal (Krige *et al.*, 2005).

O grande número de amostras calcificadas, juntamente com a baixa fertilidade, pode ser explicado tendo em conta que o valor económico individual de cada animal é geralmente alto, e como tal estes animais são (em geral) alvo de muitos cuidados veterinários. Assim, existe a possibilidade de que ao utilizar fármacos com espectro profilático, possam ter um efeito colateral nos quistos, causando a degeneração da membrana germinativa (Ponce Gordo, 1995).

CAPÍTULO 2

Em conclusão, como a fertilidade dos quistos hidáticos em ovinos é superior aos de outras espécies, estes animais têm nitidamente um papel importante na continuação do ciclo de vida do *E. granulosus*, providenciando hospedeiros intermediários capazes de perpetuar este ciclo durante gerações. Foi encontrado um maior número de quistos férteis no fígado na espécie ovina, enquanto na espécie bovina estes apresentavam-se ao nível do pulmão.

2.5. Referências bibliográficas

- ABUSHHEWA, M. H., ABUSHHIWA, M. H., NOLAN, M. J., JEX, A. R., CAMPBELL, B. E., JABBAR, A., *et al.* 2010. Genetic classification of *Echinococcus granulosus* cysts from humans, cattle and camels in Libya using mutation scanning-based analysis of mitochondrial loci. *Mol Cell Probes*, 24, 346-351
- AL-YAMAN FM, ASSAF L, HAILAT N, ABDEL-HAFEZ SK. 1985. Prevalence of hydatidosis in slaughtered animals from North Jordan. *Ann Trop Med Parasitol.* 79:501-6.
- BERHE G. 2009. Abattoir survey on cattle hydatidosis in Tigray Region of Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, 41:1347-52.
- BEATO, S., PARREIRA, R., CALADO, M., GRÁCIO, M.A.A. 2010. Apparent dominance of the G1–G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal, *Parasitol Int*, 59, 638-642
- BEATO S., PARREIRA R., ROQUE C., GONÇALVES M., SILVA L., *et al.* 2013. *Echinococcus granulosus* in Portugal: the first report of the G7 genotype in cattle. *Vet Parasitol* 198: 235–239
- BOWLES, J. & MCMANUS, D. P. 1993. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol.* 23:969-72.
- BADARACO, J.L., AYALA, F.J., BART, J.M., GOTTSTEIN, B. & HAAG, K.L. 2008. Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. *Exp Parasitol.* 119:453-9
- CARDOSO, A. S., COSTA, I. M., FIGUEIREDO, C., CASTRO, A., & CONCEICAO, M. A. 2014. The occurrence of zoonotic parasites in rural dog populations from northern Portugal. *J Helminthol*, 88, 203-209.
- DAVID DE MORAIS, J.A. 1998. A Hidatidologia Em Portugal. *Ed. Fundação Calouste Gulbenkian*, Lisboa. 334 Páginas.

CAPÍTULO 2

- DAVID MORAIS, J.A. 2007. Hidatidose Humana Estudo Clínico-Epidemiológico no distrito de Évora durante um quarto de século. *Acta Med Port*, 20: 1-10.
- DAVID DE MORAIS J.A. 2010. The rise and decline of human hydatid disease in Portugal: historical and epidemiological analysis. *Med. Int.* 17:246–256.
- DINKEL, A., NJOROGÉ, E.M., ZIMMERMANN, A., WALZ, M., ZEYHLE, E., ELMAHDI, I.E., MACKENSTEDT, U. & ROMIG, T. 2004. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol*, 34: 645-653.
- GEMMELL M.A., ROBERTS M.G., BEARD T.C., LAWSON J.R. EPIDEMIOLOGY. IN: ECKERT J., GEMMELL M.A., MESLIN F.-X., PAWŁOWSKI Z.S., EDITORS. 2001. OIE & WHO: Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. *Office Internationales Epizooties*, pp. 143–194.
- GUERRA, D., ARMUA-FERNANDEZ, M. T., SILVA, M., BRAVO, I., SANTOS, N., DEPLAZES, P., & CARVALHO, L. M. 2013. Taeniid species of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in Portugal with special focus on *Echinococcus spp.* *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 2, 50-53.
- IBRAHIM MM. 2009. Study of cystic echinococcosis in slaughtered animals in Al Baha region, Saudi Arabia: interaction between some biotic and abiotic factors. *Acta Trop*, 113, 26-33.
- KRIGE, J. E., MIRZA, K., BORNMAN, P. C., BENINGFIELD, S. J. 1995 Primary hydatid cysts of the pancreas. *S Afr J Surg.*, 43, 37-40
- LI, T., ITO, A., NAKAYA, K., QIU, J., NAKAO, M., ZHEN, R., XIAO, N., CHEN, X., GIRAUDOUX, P. & CRAIG, P. S. 2008. Species identification of human echinococcosis using histopathology and genotyping in northwestern China. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102: 585-590.
- MAILLARD, S., BENCHIKH-ELFEGOUN, M. C., KNAPP, J., BART, J. M., KOSKEI, P., GOTTSTEIN B., & PIARROUX, R. 2007. Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of

CAPÍTULO 2

- Echinococcus granulosus* in three African countries. *Parasitol Res*, 100, 495-503.
- MANTEROLA, C., BENAVENTE, F., MELO, A., VIAL, M. & ROA, J. C. 2008. Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of southern Chile. *Parasitol Int*, 57, 342-6
- MATEUS, T. L., CASTRO, A., RIBEIRO, J. N., & VIEIRA-PINTO, M. 2014. Multiple Zoonotic Parasites Identified in Dog Feces Collected in Ponte de Lima, Portugal-A Potential Threat to Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11, 9050-9067.
- MCMANUS, D.P. & THOMPSON, R.C. 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*, 127, S37-51.
- MCMANUS, D. P., ZHANG, W., LI, J., BARTLEY, P. B. 2003. Echinococcosis. *Lancet*, 362, 1295–1304.
- NAKAO, M., MCMANUS, D. P., SCHANTZ, P. M., CRAIG, P. S. & ITO, A. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, 134: 713-722.
- NJOROGE, E. M., MBITHI, P. M., GATHUMA, J. M., WACHIRA, T. M., MAGAMBO, J. K., ZEYHLE, E. A. 2002. Study of cystic echinococcosis in slaughter animals in three selected areas of northern Turkana, Kenya. *Vet. Parasitol.*, 104, 85-91.
- PONCE GORDO, F. 1995 Caracterización Biológica De Las Cepas De *Echinococcus granulosus* De Origen Español. Tesis Doctoral. Madrid. 373 Páginas.
- THOMPSON, R. C. 2008. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *ExpParasitol*, 119: 439-446.
- VURAL, G., BACA, A. U., GAUCI, C. G., BAGCI, O., GICIK, Y. & LIGHTOWLERS, M. W. 2008. Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-G3 genotype cluster. *Vet Parasitol*, 154: 347-350.

CAPÍTULO 3

Comparação da eficiência de cinco métodos de extracção de DNA de *Echinococcus granulosus* a partir de amostras biológicas

Este capítulo corresponde ao artigo submetido (com revisão) a revista de circulação internacional com arbitragem científica:

Beato, S., Roque, C., Parreira, R., Belo, J., Grácio, M.A. (2015). Comparative performance of five different methods for the extraction of *Echinococcus granulosus* DNA from biological samples. World Journal of Microbiology and Biotechnology.

Resumo

O *Echinococcus granulosus* é o agente etiológico da hidatidose/equinococose. É um céstode com distribuição mundial e apresenta uma grande variabilidade genética, o que justifica a sua classificação em vários genótipos, tendo inclusivamente alguns deles adquirido recentemente o estatuto de novas espécies. Atualmente, a controvérsia ao redor da sua classificação taxonómica tem sido estudada por inferência filogenética utilizando sequências de DNA obtidas a partir de amostras biológicas.

Neste estudo foi comparada a performance de 5 métodos de extração de DNA, a partir de protoscólices de *E. granulosus*. Esta comparação foi efetuada tendo como base a eficiência da extração, a reprodutibilidade e a pureza do DNA. As quantificações foram efetuadas por espectrofotometria, excepto a integridade do DNA, avaliada através da amplificação do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (*COI*).

A versão modificada do método de extração fenol-clorofórmio demonstrou ser o método mais eficaz para a extração de DNA, no entanto o grau de pureza não é o ideal. Apesar disso, este baixo grau de pureza das amostras não impediu a amplificação do gene *COI* por PCR. Resumindo, o *High pure PCR template preparation kit* foi considerado como o método de eleição para a extração de DNA de *E. granulosus*.

Palavras-chave: *Echinococcus granulosus*, extração DNA, concentração DNA, pureza DNA

CAPÍTULO 3

World Journal of Microbiology and Biotechnology
Comparative performance of five different methods for the extraction of Echinococcus granulosus DNA from biological samples.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Comparative performance of five different methods for the extraction of Echinococcus granulosus DNA from biological samples.
Article Type:	Original Article
Keywords:	Echinococcus granulosus, DNA extraction, DNA concentration, DNA purity
Corresponding Author:	Sílvia Beato, M.D., MSc Instituto Politecnico de Castelo Branco Castelo Branco, Castelo Branco PORTUGAL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Instituto Politecnico de Castelo Branco
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Sílvia Beato, M.D., MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Sílvia Beato, M.D., MSc Cláudio Roque, MSc Ricardo Parreira, PhD João Belo, MSc, PhD Maria Amélia Grácio, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PT) (SFRH/BD/60408/2009) Dr Sílvia Beato
Abstract:	<p>Echinococcus granulosus, the etiological agent of hydatidosis/echinococcosis, is a cestode with worldwide distribution and considerable genetic variability. This justifies its classification into multiple, so-called genotypes, some of which have already attained species status. Currently, the controversies regarding the taxonomy of E. granulosus have been addressed using phylogenetic inference tools that explore DNA sequence information, usually obtained from amplified genomic segments using DNA extracted from E. granulosus protoscoleces.</p> <p>In this study, we compare five different methods for DNA extraction of E. granulosus protoscoleces and compare them, in terms of extraction efficiency, reproducibility and purity of extracted samples. All measurements were carried out by spectrophotometry, except for the assessment of DNA integrity, which was achieved by partial amplification of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 coding gene.</p> <p>A modified version of the phenol-chloroform method proved to be the most efficient method for DNA extraction, but samples prepared in such a way were amongst the least pure. Nevertheless, this lower purity did not seem to preclude the amplification of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 coding gene sequences, by PCR. The "High pure PCR template preparation kit" was considered the best method for the extraction of E. granulosus DNA.</p>

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

Title: Comparative performance of five different methods for the extraction of *Echinococcus granulosus* DNA from biological samples.

S. Beato^{1,2}, C. Roque¹, R. Parreira³, J. Belo¹ and MA. Grácio²

¹ Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Campus da Talagueira, 6000-767 Castelo Branco, Portugal.

² Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM), Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal.

³ Unidade de Microbiologia Médica (Grupo de Virologia), IHMT/UPMM/UNL, Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal.

Corresponding author: Silvia Beato, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Campus da Talagueira, 6000-767 Castelo Branco, Portugal. Phone: (+351) 272340560 Fax: (+351) 272340568.

Email: silviabeato@ipcb.pt

Abstract

Echinococcus granulosus, the etiological agent of hydatidosis/echinococcosis, is a cestode with worldwide distribution and considerable genetic variability. This justifies its classification into multiple, so-called genotypes, some of which have already attained species status. Currently, the controversies regarding the taxonomy of *E. granulosus* have been addressed using phylogenetic inference tools that explore DNA sequence information, usually obtained from amplified genomic segments using DNA extracted from *E. granulosus* protoscoleces.

In this study, we compare five different methods for DNA extraction of *E. granulosus* protoscoleces and compare them, in terms of extraction efficiency, reproducibility and purity of extracted samples. All measurements were carried out by spectrophotometry, except for the assessment of DNA integrity, which was achieved by partial amplification of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 coding gene.

A modified version of the phenol-chloroform method proved to be the most efficient method for DNA extraction, but samples prepared in such a way were amongst the least pure. Nevertheless, this lower purity did not seem to preclude the amplification of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 coding gene sequences, by PCR. The “High pure PCR template preparation kit” was considered the best method for the extraction of *E. granulosus* DNA.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, DNA extraction, DNA concentration, DNA purity.

Introduction

The cestodes included in the genus *Echinococcus* not only represent a considerable burden for human health, livestock production and wildlife ecology on a global scale, but also, in several geographical regions, the parasite's distribution is also increasing (Thompson 2008; Petrigh and Fugassa 2013). Among these, *Echinococcus granulosus*, the etiologic agent of hydatidosis/echinococcosis, can be found in several animal species and may cause accidental infections in humans. Despite being the smallest *Taenia* of medical importance, it remains one of the most important zoonotic helminthes (Beato 2009; Rey 2010).

The *Echinococcus* genus is diverse, with many different members, and these have adapted to different life cycle patterns, involving a diversity of host assemblages (Eckert and Deplazes 2004). However, the identification of which species is present in a given context has been hampered by considerable confusion and/or controversy regarding their taxonomy (Lymbery *et al.* 2015). For example, molecular studies based on the analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) pointed to the existence of 10 distinct genotypes of *E. granulosus* (G1–G10) with worldwide distribution, some of which have been assigned to the level of individual species (Capuano *et al.* 2006; Huttner *et al.* 2008). Currently, the reviewed taxonomy of the genus proposes the existence of *E. granulosus sensu stricto* (G1, G2 and G3), *E. equinus* (G4) and *E. ortleppi* (G5) and its sister species, *E. canadensis*, including genotypes G6 to G10 (Nakao *et al.* 2007; McManus 2013). *E. felidis*, a sister taxon of *E. granulosus s.s.*, has also been proposed (Huttner *et al.* 2008; Sharbatkhori *et al.* 2010). The sheep strain (G1) of *E. granulosus s.s.* is not only the most cosmopolitan form of the parasite but also the one most commonly associated with human infections (Capuano *et al.* 2006).

Echinococcus species assignment is, at present, based on molecular approaches that make use of polymerase chain reaction (PCR), due to its sensitivity and specificity, allowing for the amplification of the parasite's genomic DNA from small amounts of biological material. However, the performance of any technique based on the amplification of DNA is significantly impacted by the amount and purity of the DNA template in a given sample. In most cases, molecular studies make use of commercial kits for the extraction of *Echinococcus* total genomic DNA (Maillard *et al.* 2007; Beato *et al.* 2010). However, such kits can be expensive and are not always readily available in some laboratory settings. As previous studies have indicated, the *E. granulosus s. s.* (G1-G3) is the dominant parasite specie in continental Portugal

CAPÍTULO 3

(Beato *et al.* 2010; Beato *et al.* 2013). The evolution of molecular studies requires better methodologies to extract biological products, so in this report we compare five different methods of DNA extraction from *E. granulosus* protoscoleces, in order to identify a method with a high accuracy and DNA quality for this parasite.

Materials and Methods

Parasite specimens

Fertile visceral (lung and liver) hydatid cysts from parasitized animals (cattle and sheep) were obtained from slaughterhouses, mostly (for logistical reasons) distributed over the central inland regions of Portugal. The fluid from each cyst containing protoscoleces was sucked out of the cyst, using a sterile syringe, and resuspended with PBS (phosphate buffered saline). Protoscoleces were sedimented by centrifugation (1500rpm, 5 minutes) and the pellet was carefully collected to another tube with PBS, where it was once again resuspended. After that, the protoscoleces were washed with PBS, resuspended and centrifuged (1500rpm, 5 minutes), for three consecutive times. On the last washing step, the supernatant was carefully removed and subsequently, 250µL of 70% ethanol was added. Further to this, at the end, all protoscoleces were resuspended and stored at -20°C in 5 aliquots of 50µL each. All the fluid from the cysts were treated as independent samples and all manipulations were carried out under aseptic conditions.

DNA extraction

As mentioned before, this study compares five methods for DNA extraction from *E. granulosus* protoscoleces. Four commercial kits and a modified version of the phenol-chloroform extraction method (Sambrook *et al.* 1989) for total DNA extraction were used.

Before performing the DNA extraction protocols, samples were prepared for extraction. This initial treatment was carried out to remove the ethanol from the protoscoleces samples. This was done to each of the 50µL protoscoleces aliquots (stored at -20°C, as described above), the exact amount used on each of the several DNA extraction methodologies. Initially, the ethanol supernatant was removed after

CAPÍTULO 3

centrifugation (1500rpm, 5 minutes) and the protoscolecocytes were resuspended with PBS. The protoscolecocytes were then washed with: PBS, resuspended and centrifuged (1500rpm, 5 minutes), for three consecutive times. Once this initial washing step was done, samples were ready to be processed with the various extraction methodologies that were compared on this study.

We extracted DNA from 20 different samples, with each method, where each fertile cyst represents one different sample.

The commercial kits used were: the “High pure PCR template preparation kit” (Roche, Germany), the “QIAamp DNA mini kit” (Qiagen, Germany), the “RNeasy Tissue DNA Mini kit” (Bioron, Germany), and the “Wizard Genomic DNA Purification kit” (Promega, USA). All commercial kits were used according to the instructions provided by their respective manufacturers.

The modified version of the phenol-chloroform extraction method was based on what was described by Sambrook *et al.* (Sambrook, Fritsch *et al.* 1989), and was carried out as described above. After the initial washing step, PBS supernatant was removed and the pellet resuspended with 300µL of lysis buffer. The suspension was then incubated at 37°C with agitation for 5 minutes, after which 20µL of proteinase K (100 mg/ml) was added. The content of each tube was homogenized and incubated in a water bath at 55°C for 3 hours, with intermittent vortexing. Subsequently, 350µL of the phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (25:24:1) was added and the solution was homogenized several times, followed by centrifugation (13000rpm, 5 minutes, 4°C) for phase separation. The upper aqueous phase was carefully removed to another tube and an equal volume of isoamyl alcohol:chloroform (148:1) to this was added, followed by a centrifugation step (13000rpm, 5 minutes, 4°C). Nucleic acids were precipitated at -20°C for 30 minutes using 2 volumes of absolute ethanol and 1/10 volume of sodium acetate (3M, pH 5.2), followed by centrifugation (13000rpm, 15 minutes). The pellet obtained was washed twice with cold (-20°C) 70% ethanol, dried, dissolved in nuclease-free distilled water, and finally stored at -80°C until further use.

DNA quantification and quality assessment

For each DNA extraction, the two variables taken under consideration (DNA concentration and purity) were assessed by spectrophotometric measurements using a *GeneQuant* (GE LifeSciences, United

CAPÍTULO 3

Kingdom). All procedures were performed according to the manual, and the spectrophotometer automatically calculated all values.

DNA concentration in each extract was calculated from optical density readings at 260 nm and the results presented as amount of DNA in ng per μL . The purity of each extract was assessed based on the ratio of absorbance at 260 and 230 nm ($A_{260/230}$) and 260 and 280 nm ($A_{260/280}$).

Amplification of extracted DNA

The integrity of the extracted DNA was assessed based on the analysis of 5 randomly selected samples, prepared for each method used (total of 25) via the targeted amplification of *Echinococcus* DNA by PCR, using the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 coding gene (*COI*). PCR amplifications were carried out using 25 ng of input DNA, the JB3 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') and JB4.5 (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3') primer pair and the reaction conditions previously described by Bowles and collaborators (1992). Amplification products (approximately 460 bp) were visualized after electrophoresis in ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel, by comparison with a 1000pb ladder.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the SPSS (IBM Software, USA) statistical package. All descriptive statistics (mean, standard deviation, minimum, maximum, range and 95% confidence interval for the mean) were calculated for each methodology tested, taking into account the two considered variables: DNA concentration and purity ($A_{260/230}$ and $A_{260/280}$ ratios).

CAPÍTULO 3

Results

Table 1 summarizes the statistical analysis of total DNA concentration results of the different methodologies tested. Taking into consideration only the concentration of total DNA extracted, it became evident that the best extraction yield was obtained using the modified phenol-chloroform extraction method, with a mean of 219.04 ng/ μ L. This value was approximately seven times higher than the one obtained with the second-most efficient method, the “High pure PCR template preparation kit”, with a mean value of 31.26 ng/ μ L. Solely based on the apparent efficiency of DNA extraction, the “QIAamp DNA mini kit” provided the lowest extraction efficiency, with a mean value of 3.84 ng/ μ L. This corresponds to relative extraction efficiency approximately 57 times lower than the phenol-chloroform extraction method.

The purity of the DNA extract was assessed based on the spectrometric analysis of the $A_{260/230}$ and $A_{260/280}$ ratios measured for each sample, where a value greater than 2 and 1.8, respectively, is considered “pure” DNA (Parr 2002; McManus 2013). Tables 2 and 3 summarize the statistical analysis performed to assess the purity of each DNA extraction methodology based on $A_{260/230}$ ratio (Table 2) and $A_{260/280}$ (Table 3).

The results presented in table 2 clearly show that none of the tested methodologies on this study have the ability to extract “pure” DNA. The most accurate methodology to extract “pure” DNA was the “High pure PCR template preparation kit” with a mean value of 1.38, and the second most accurate was the modified phenol-chloroform method with a mean of 1.03. The method with the lowest performance in terms of DNA purity at $A_{260/230}$ ratio was the “Wizard Genomic DNA purification kit” with a mean value of 0.30.

Table 3 presents the results of the statistical analysis of purity ($A_{260/280}$), it becomes evident that using the DNA extraction kits according to the manufacturer’s guidelines, it is possible to get higher purity levels of DNA. The average $A_{260/280}$ ratio of DNA extracted samples, prepared using the “QIAamp DNA mini” and “High pure PCR template preparation kit”, was 1.88 and 1.91 respectively, while mean values of 1.69 and 1.56, were respectively obtained using “Ron’s Tissue DNA mini” and “Wizard Genomic DNA purification kit”. To put this in a different perspective, the most efficient method for DNA extraction (in

CAPÍTULO 3

terms of obtained DNA concentration quantities) was the modified phenol-chloroform method. This method had a clearly lower performance, in terms of DNA extraction purity, with an $A_{260/280}$ of 1.16.

By analyzing the descriptive statistics, the modified phenol-chloroform extraction method was by far the most efficient method, in terms of the amount of total DNA extracted from each sample. The second most efficient extraction method (“High pure PCR template preparation kit”) allowed us to obtain DNA of considerably higher purity.

According to what has been stated so far, the integrity of the extracted DNA and the potential impact of the presence of amplification inhibitors were assessed through a PCR assay, with the amplification of a fragment of the *COI* sequence. The amplicons obtained through this assay (Figures 1 and 2) revealed that with the “QIAamp DNA mini kit”, “Ron’s Tissue DNA Mini kit” and “Wizard Genomic DNA Purification kit”, there is no amplification. Amplification of the obtained DNA samples with the modified phenol-chloroform extraction method shows positive results in four out of five samples. Samples extracted with the “High pure PCR template preparation kit” showed amplification of five out of five samples, suggesting that this kit was able to amplify our DNA.

Discussion

The taxonomy of *Echinococcus* has remained unclear due to the inconsistent assignments of the described genotypes, species and subspecies (Moro *et al.* 2009). When exclusively based on morphological features, the classification of these parasites has proven to be unable to describing the genetic diversity of the genus (Hanifian *et al.* 2013). Alternatively, several molecular studies have explored the sequence of information extracted from the analysis of different mtDNA sequence markers, in an attempt to correctly characterize the different *Echinococcus* species (Capuano *et al.* 2006; Huttner *et al.* 2008; Moro *et al.* 2009).

The choice of a DNA extraction methodology is a fundamental decision when it comes to setting up a molecular-based study, because it is precisely the starting point for all downstream applications of the extracted DNA. As such, it is important to ensure that the obtained DNA samples meet the demands of

CAPÍTULO 3

the molecular technique that will be performed, in terms of absolute amount of extracted DNA and its purity. Most molecular studies based on the analysis of *Echinococcus* mtDNA markers make use of commercial kits for the extraction of total genomic DNA (Bart *et al.* 2006; Busi *et al.* 2007; Maillard *et al.* 2007; Beato *et al.* 2010; Tappeh *et al.* 2012; Hanifian *et al.* 2013). However, such kits are relatively expensive and are not always readily available in some laboratory settings. Furthermore, some of those may also require secondary purification steps, for an effective removal of PCR amplification inhibitors that contaminate the DNA extract after the suggested protocol is completed (Petrih and Fugassa 2013).

Due to its importance, the efficiency of DNA extraction from biological samples, such as *Echinococcus* protoscoleces, is a current issue and has been previously addressed in the literature (Zhang *et al.* 1998; Busi *et al.* 2007; Maillard *et al.* 2007; Sharbatkhori *et al.* 2009; Nejad *et al.* 2011; Tappeh *et al.* 2012; Hanifian *et al.* 2013). In these studies, different commercially available DNA extraction kits were evaluated, in terms of DNA extraction efficiency and purity of obtained extract. Less often, the efficiency of the commercial methods has been compared with the phenol-chloroform DNA extraction technique (Sambrook *et al.* 1989) or its variants, which explore different ways of cell disintegration in order to increase the extraction efficiency, namely, glass beads, mechanical grinder, performed freeze-thawing, boiling or crushing (Sharbatkhori *et al.* 2009).

In this study we compared the performance of five methodologies to extract DNA from *Echinococcus* protoscoleces; four commercial kits (“High pure PCR template preparation kit”, “QIAamp DNA mini kit”, “Ron’s Tissue DNA Mini kit”, and the “Wizard Genomic DNA Purification kit”) and a modified version of the phenol-chloroform DNA extraction method. Although DNA extraction methods used in this study have already been referred in the literature for the extraction of *Echinococcus* total DNA (Zhang *et al.* 1998; Bart *et al.* 2006; Busi *et al.* 2007; Maillard *et al.* 2007; Nejad *et al.* 2011; Hanifian *et al.* 2013), their performance has never been compared simultaneously. This comparison was carried out, not only in absolute terms, regarding their efficiency in DNA extraction (expressed in terms of its concentration and purity), but also in terms of relative consistency/reproducibility.

Any method for comparing the performance of DNA extraction methods must take into account two variables: DNA concentration and its purity. DNA concentration may determine the success of the subsequent amplification reactions, especially if insufficient amounts are extracted from a given sample.

CAPÍTULO 3

Additionally, the purity of the extracted DNA is also crucial, since the presence of putative impurities in the DNA extract may inhibit all subsequent amplification attempts (Olson and Morrow 2012). DNA concentration and purity are usually measured using either one of three basic methods: UV spectroscopy, fluorometry or qPCR (Brennan *et al.* 2009; Olson and Morrow 2012). In this study, both variables were quantified by UV spectroscopy, using GeneQuant Pro equipment, which performed optical density readings at 260 nm for the assessment of DNA concentrations, while the purity of each extraction methodology was analyzed using the on the $A_{260/230}$ and $A_{260/280}$ ratios (Parr 2002). The main advantage of UV spectroscopy is the availability of micro volume instruments that are faster, easier to use, and require less sample volume (Rothrock 2011).

The spectrophotometric analysis of DNA is based on three measurements performed, by the spectrophotometer at 230, 260 and 280 nm (Parr 2002). Nucleic acids are quantified at 260nm, as it is at this wavelength that a peak in the absorbance spectrum for nucleic acids takes place. It is well established that a DNA solution with an optical density of 1.0 has a concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ in a 10 mm path length cell (Parr 2002). The 260nm reading is taken near the top of a broad peak in the absorbance spectrum for nucleic acids, whereas the 280 nm reading is taken on a steep slope where it is expected that the absorbance of “pure” DNA samples have a significantly lower value. If not, this is an indication of impurities (Parr 2002). Consequently, it is expected that “pure” DNA samples have an $A_{260/280}$ ratio higher than 1.8. Deviations from this value indicate the presence of impurities on the samples, such as proteins or phenol (Parr 2002). The $A_{260/230}$ ratio is also an indicator of purity. A high absorbance at 230 nm, can indicate the presence of other impurities, such as peptide bonds, buffer contaminations (Tris-EDTA and other Buffer salts), salts or residual guanidine (often used in column based kits). Due to this, it is expected that “pure” DNA samples have an $A_{260/230}$ ratio higher than 2, otherwise we may suspect the presence of the referred impurities (Parr 2002). Residual chemical contamination from nucleic acid extraction procedures may result in an overestimation of the nucleic acid concentration and have a negative influence on future molecular studies (Parr 2002; Ning *et al.* 2009; Olson and Morrow 2012).

In this study, a modified version of the phenol-chloroform DNA extraction method outperformed all other methods tested with a mean DNA concentration of 219,04 $\text{ng}/\mu\text{L}$. This value was approximately 7 times higher than the one obtained with the second-most efficient method tested (“High pure PCR template

CAPÍTULO 3

preparation kit”) with a mean DNA concentration of 30.79 ng/μL. However, this modified version of the phenol-chloroform DNA extraction method clearly surpassed the extraction efficiency of all the other methods tested (Table 1). The modified phenol-chloroform extraction method seems to be more efficient in the extraction of genomic DNA from *Echinococcus* protoscoleces. The low standard deviation (13.52 ng/μL) associated with the mean and the low 95% confidence interval for the mean values (212.71 to 225.37 ng/μL) are suggestive of good consistency and reproducibility of the method's good consistency and reproducibility. The “High pure PCR template preparation kit”, with a mean DNA concentration of 31.26 ng/μL, proved to be the second-most effective method to extract DNA. The mean value obtained with this kit, in terms of DNA amount for further molecular studies (Beato 2009). However, this method showed considerable dispersion, with a standard deviation of 30.79 ng/μL and a high variation of the 95% confidence interval for the mean (16.45 to 46.08 ng/μL), which indicates a substantially lower reproducibility than the modified phenol-chloroform extraction method.

The purity of the samples based on the $A_{260/230}$ ratio (Table 2) shows that none of the tested methodologies on this study has the ability to extract “pure” DNA. If we analyze the mean values for all extraction methods we can conclude that none has a mean higher than 2, which indicates that none of the studies has the ability to effectively eliminate the peptide bonds, buffer contaminations, salts or residual guanidine. The extraction method that registered the best performance at the $A_{260/230}$ ratio was the “High Pure PCR Template Preparation kit”, with a mean value of 1.38. This method has also proven to be consistent and reproducible, with low standard deviation (0.58) and low 95% confidence interval for the mean (1.10 to 1.65).

The purity of the samples, based on the $A_{260/280}$ ratio (Table 3) shows that only the “High pure PCR Template Preparation kit” and the “QIAamp DNA mini kit” have the ability to extract “pure” DNA, with mean values of 1.91 and 1.88, respectively. Both have low standard deviations (0.14 and 0.12, respectively) and low 95% confidence intervals for the mean (1.84-1.98 and 1.83-1.94, respectively); this indicates good consistency and reproducibility. In contrast, the apparently most efficient method of extraction large amounts of DNA, the modified phenol-chloroform method, was clearly the method with lower performance, in terms of purity of extracted DNA on the $A_{260/280}$ ratio, with a mean of 1.16. This shows that with these methodologies, the DNA obtained has large amounts of impurities, and this may be

CAPÍTULO 3

due to the reagents used during the extraction protocol, namely phenol. It is known that phenol absorbs at the 270 nm wavelength (Parr 2002), and as this protocol is based on the use of phenol (a protein denaturant), it seems to be possible that this result, on the $A_{260/280}$ ratio, may be justified by the inability to properly dispose of phenol during the washing steps.

Although purity ratios are important indicators of sample quality, the best indicator of “pure” DNA is its applicability in molecular and genetic tests. Therefore, if problems occur during subsequent molecular studies, the inclusion of additional washing steps in the extraction protocol should be considered, and/or a purification step, after extraction, to increase the purity of the obtained DNA preparation.

A relevant question can be asked, due to the fact when we compare the result of the $A_{260/280}$ ratio with the concentration DNA we suspect that the large amounts of DNA obtained with the modified phenol-chloroform method may be overestimated. This assumption is based on what was described before. If phenol absorbs approximately at 270 nm when we quantify DNA concentrations based on the 260 nm readings, this amount of phenol (not properly eliminated), may influence the quantification of DNA.

Combining the two variables taken into consideration on this study (DNA concentration and DNA purity) and analyzing them, we conclude that, in terms of performance, the best methodology to extract DNA from *E. granulosus* protoscoleces was the “High pure PCR Template Preparation kit”. This statement is supported by the results that this kit showed on DNA concentration, $A_{260/230}$ and $A_{260/280}$ ratios. With this kit, were able to extract enough DNA for future molecular studies and among the several extraction methodologies tested, this was the one that gave the best performance on quality parameters.

However, the modified version of the phenol-chloroform DNA extraction method might be regarded as the first choice, when the main goal is to maximize DNA extraction efficiency, or when financial and/or call constraints in some laboratory settings limit the use of commercially available DNA extraction systems. In its current format, the method might preclude the use of the obtained samples in downstream assays, because relative purity of the samples, which could be improved with additional washing steps or subsequent purification, before molecular studies.

As previously stated, the best indicator of “pure” DNA is its applicability in molecular applications. To test the integrity and the potential impact of the presence of amplification inhibitors on subsequent

CAPÍTULO 3

molecular studies we selected 5 random samples obtained from all extractions methods. This test was carried out using a PCR assay with a reference pair of primers (JB3 and JB4.5) for *COI*, which is widely used to amplify the mtDNA region from *E. granulosus* (Busi *et al.* 2007; Boubaker *et al.* 2013; Petrih and Fugassa 2013). All amplification reactions were carried out according to what was previously described by Bowles and collaborators (1992) and amplification products (approximately 460 bp) were visualized after electrophoresis in ethidium bromide stained-1.5% agarose gel, by comparison with a 1000pb ladder.

Figure 1 and 2 show the results of the electrophoresis gel and as we can observe, with “QIAamp DNA mini kit”, “Ron’s Tissue DNA Mini kit” and “Wizard Genomic DNA Purification kit” there is no amplification. This indicates that those DNA extraction methodologies do not have the capacity to extract DNA with quality and/or quantity to be amplified on subsequent molecular studies.

The only two methodologies that were able to extract DNA with enough quality and/or purity to be amplified were the modified phenol-chloroform extraction method and the “High pure PCR template preparation kit”. With the first method, samples 1, 2, 4 and 5 were amplified, and with the second one, all samples were amplified. This indicates that, despite the lowest purity ratios of the modified phenol-chloroform extraction method, its higher DNA concentrations were enough to promote the amplification of most samples, but not all of them. If we compare that method with the “High pure PCR template preparation kit” we can see a relative difference. First, we have the amplification of all samples and second the intensity of amplicons is higher. This fact could be due to the higher quality standards that are obtained with the commercial kit.

Analyzing all data we can conclude that the choice of the DNA extraction methodology is a fundamental step for molecular studies. If we have small amounts of DNA and if that DNA has low purity, our downstream molecular assays could be jeopardized, due to the amplification inhibitors.

The use of a modified phenol-chloroform method proved to be the most efficient method for DNA extraction, but the samples prepared in such a way were among the least pure. Nevertheless, this lower level of purity did not seem to preclude the amplification of *COI* sequences by PCR. The only extraction

CAPÍTULO 3

methodology that was able to extract DNA from *E. granulosus*, with quality and quantity on every sample to be amplified, was the “High Pure PCR template preparation kit”.

Bibliography

- Bart JM, Morariu S, Knapp J, Ilie MS, Pitulescu M, Anghel A, Cosoroaba I, Piarroux R (2006) Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res* 98(2):130-137.
- Beato S (2009) Contributo para a caracterização molecular de *Echinococcus granulosus* em Portugal. Dissertation, Universidade Nova de Lisboa.
- Beato S, Parreira R, Roque C, Goncalves M, Silva L, Maurelli MP, Cringoli G, Gracio MA (2013) *Echinococcus granulosus* in Portugal: the first report of the G7 genotype in cattle. *Vet Parasitol* 198(1-2):235-239.
- Beato S, Parreira R, Calado M, Gracio MA (2010) Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal. *Parasitol Int* 59(4):638-642.
- Boubaker G, Macchiaroli N, Prada L, Cucher MA, Rosenzvit MC, Ziadinov I, Deplazes P, Saarma U, Babba H, Gottstein B, Spiliotis, M (2013) A multiplex PCR for the simultaneous detection and genotyping of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS Negl Trop Dis* 7(1):e2017.
- Bowles J, Blair D and McManus DP (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54(2):165-173.
- Brennan RG, Rabb S, Holden MJ, Winchester MR, Turk GC (2009) Potential primary measurement tool for the quantification of DNA. *Analytical Chemistry* 81(9):3414-3420.
- Busi M, Snabel V, Varcasia A, Garippa G, Perrone V, De Liberato C, D'Amelio S (2007) Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol* 150(1-2): 75-83.
- Capuano F, Rinaldi L, Maurelli MP, Perugini AG, Veneziano V, Garippa G, Genchi C, Musella V, Cringoli G (2006) Cystic echinococcosis in water buffaloes: epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains. *Vet Parasitol* 137(3-4):262-268.
- Eckert J, Deplazes P (2004) Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews* 17(1):107-135.
- Hanifian H, Diba K, Tappeh KH, Mohammadzadh H, Mahmoudlou R (2013) Identification of *Echinococcus granulosus* Strains in Isolated Hydatid Cyst Specimens from Animals by PCR-RFLP Method in West Azerbaijan – Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 8(3):376-381.
- Huttner M, Nakao M, Wassermann T, Siefert L, Boomker JD, Dinkel A, Sako Y, Mackenstedt U, Romig T, Ito A (2008) Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol* 38(7):861-868.
- Lymbery AJ, Jenkins EJ, Schurer JM, Thompson RC (2015) *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name?. *Trends in Parasitology* 31(4):121-126.
- Maillard S, Benchikh-Elfegoun MC, Knapp J, Bart JM, Koskei P, Gottstein B, Piarroux R (2007) Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries. *Parasitol Res* 100(3):495-503.
- McManus DP (2013) Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology* 140(13): 1617-1623.

CAPÍTULO 3

- Moro PL, Nakao M, Ito A, Schantz PM, Caverio C, Cabrera L (2009) Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitol Int* 58(2):184-186.
- Nakao M, McManus DP, Schantz PM, S. CP, Ito A (2007) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134(5):713-722.
- Nejad R, Roshani M, Lahmi M, Mojarad F (2011) Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Echinococcus granulosus* genotype I. *Journal of Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 444:91-94.
- Ning J, Liebich J, Kastner M, Zhou J, Schaffer A, Burauel P (2009) Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study. *Appl Microbiol Biotechnol* 82(5):983-993.
- Olson N, Morrow J (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes* 5(668):1-14.
- Parr D (2002) *GeneQuant pro User Manual*. Cambridge, Biochrom Ltd.
- Petrigh RS, Fugassa MH (2013) DNA extraction and a cost-effective detection method for *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Vet Parasitol* 198(3-4):410-413.
- Rey L (2010) *Bases da Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Rothrock MJ (2011) Comparison of microvolume DNA quantification methods for use with volume-sensitive environmental DNA extracts. *Journal of Natural and Environmental Sciences* 2(1):34-38.
- Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sharbatkhori M, Kia EB, Fasihi HM, Jalalizand N, Zahabiun F, Mirhendi H (2009) Comparison of five simple methods for DNA extraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces for PCR amplification of ribosomal DNA. *Iranian Journal of Parasitology* 4(2):54-60.
- Sharbatkhori M, Mirhendi H, Harandi MF, Rezaeian M, Mohebbali M, Eshraghian M, Rahimi H, Kia EB (2010) *Echinococcus granulosus* genotypes in livestock of Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. *Exp Parasitol* 124(4):373-379.
- Tappeh KH, Hanifian H, Diba K (2012) Comparison of four methods for DNA extraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Turkiye Parazitolo Derg* 36(2):100-104.
- Thompson RC (2008) The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol* 119(4):439-446.
- Zhang LH, Chai JJ, Jiao W, Osman Y, McManus DP (1998) Mitochondrial genomic markers confirm the presence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Parasitology* 116(1):29-33.

CAPÍTULO 3

Tables:

Table 1 – Statistical analysis of DNA concentration as a function of the extraction method used.

Method	Mean	Std. dev.	Min.	Max.	Range	95% CI
<i>Phenol-chloroform method</i>	219.04	13.52	192.70	244.60	51.90	212.71 – 225.37
<i>High pure PCR template preparation Kit</i>	31.26	30.79	5.20	103.00	97.80	16.45–46.08
<i>Ron's Tissue DNA mini Kit</i>	8.37	3.55	3.60	16.20	12.60	6.66–10.08
<i>Wizard Genomic DNA purification kit</i>	4.54	2.37	2.00	10.50	8.50	3.43–5.65
<i>QIAamp DNA mini kit</i>	3.84	2.07	2.00	8.20	6.20	2.77–4.89

CI-Confidence interval for the mean; Min.-Minimum; Max-maximum; Std. dev.-Standard deviation.

CAPÍTULO 3

Table 2 – Statistical analysis of purity ($A_{260/230}$ ratio) as a function of the extraction method used.

Method	Mean	Std. Dev.	Min.	Max.	Range	95% CI
<i>High pure PCR template preparation Kit</i>	1.38	0.58	0.35	2.16	1.82	1.10 – 1.65
<i>Phenol-Chloroform method</i>	1.03	0.07	0.98	1.30	0.33	1.00 – 1.06
<i>QIAamp DNA mini kit</i>	0.82	1.00	0.21	2.71	2.50	0.35 – 1.29
<i>Ron's Tissue DNA mini Kit</i>	0.82	1.01	0.21	2.71	2.50	0.35 – 1.29
<i>Wizard Genomic DNA purification kit</i>	0.30	0.09	0.21	0.57	0.37	0.26 – 0.34

CI-Confidence interval for the mean; Min.-Minimum; Max-maximum; Std. dev.-Standard deviation.

CAPÍTULO 3

Table 3 – Statistical analysis of purity ($A_{260/280}$ ratio) as a function of the extraction method used.

Method	Mean	Std. Dev.	Min.	Max.	Range	95% CI
<i>High pure PCR template preparation Kit</i>	1.91	0.14	1.61	2.26	0.65	1.84–1.98
<i>QIAamp DNA mini kit</i>	1.88	0.12	1.67	2.10	0.43	1.83–1.94
<i>Ron's Tissue DNA mini Kit</i>	1.69	0.06	1.62	1.86	0.24	1.66–1.72
<i>Wizard Genomic DNA purification kit</i>	1.56	0.22	1.09	1.86	0.77	1.46–1.66
<i>Phenol-Chloroform method</i>	1.16	0.04	1.11	1.26	0.15	1.14–1.17

CI-Confidence interval for the mean; Min.-Minimum; Max-maximum; Std. dev.-Standard deviation.

Figures:

Fig. 1: Comparison of PCR-amplified partial COI mitochondrial fragments from *Echinococcus sp.* with JB3 and JB4.5 primers. (A – QIAamp DNA mini kit; B – High Pure PCR template preparation kit; C – Modified version of phenol-chloroform extraction method. 1, 2, 3, 4 and 5 – Samples; L – Ladder)

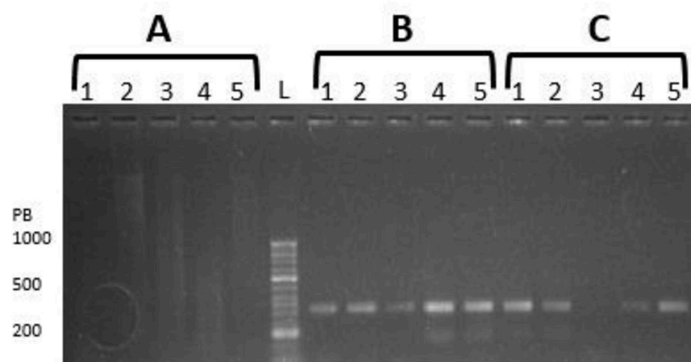
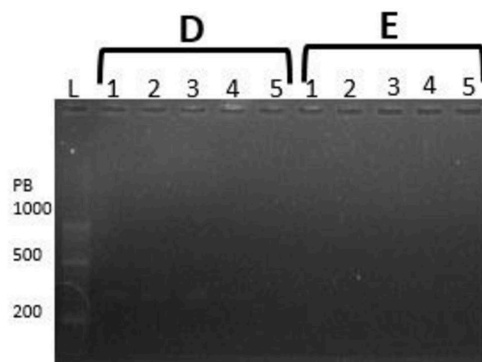


Fig. 2: Comparison of PCR-amplified partial COI mitochondrial fragments from *Echinococcus sp.* with JB3 and JB4.5 primers. (D – Ron's Tissue DNA Mini kit; E – Wizard Genomic DNA Purification kit. 1, 2, 3, 4 and 5 – Samples; L – Ladder)



CAPÍTULO 4

**Dominância aparente do complexo genético
G1-G3 de *Echinococcus granulosus* na região
centro de Portugal**

Este capítulo corresponde ao artigo publicado em revista de circulação internacional com arbitragem científica:

Beato, S., Parreira, R., Calado, M.C., Grácio, M.A. (2010). **Apparent dominance of the G1-G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal.** Parasitology International, 59(4):638-42.

Resumo

A infecção pelo estadio larvar do cestode *Echinococcus granulosus* provoca uma doença conhecida como equinococose ou hidatidose, que é uma das infecções zoonóticas mais comuns de importância veterinária e médica. Numerosos estudos têm demonstrado que o *E. granulosus* existe como um complexo de estirpes diferentes e apresenta uma ampla variedade de critérios para a sua identificação. Dez genótipos distintos (G1-G10) foram identificados como tendo potencial impacto sobre a patologia, epidemiologia e medidas implementadas para o controlo da hidatidose.

O principal objectivo deste estudo foi realizar uma análise preliminar dos genótipos de *E. granulosus* que circulam na região central do interior de Portugal.

As amostras de parasitas (quistos hidáticos, n = 27) foram isolados a partir do fígado e do pulmão de bovinos e ovinos. O DNA extraído de isolados de protoescólices dos quistos férteis serviram de base para a amplificação por PCR de uma parte dos genes mitocondriais citocromo c oxidase subunidade 1 (*cox1*) e ATP sintase F0 subunidade 6 (*atp6*), bem como as grandes *rrnL* / (16S) e pequenas (*rrnS* / 12S) genes de RNA ribossómico.

Foram feitas comparações nas bases de dados com sequências homólogas que indicaram uma muito alta similaridade com as referências atribuídas ao G1, G3 e / ou complexo G1-G3 de *Echinococcus*. A análise filogenética (Abordagem Bayesiana) apoiou essas observações, e confirmou a atribuição de todas as sequências analisadas para o cluster genético G1-G3.

Palavras-chave: *Echinococcus granulosus*; quisto hidático; genótipos G1-G3; Portugal; DNA mitocondrial

CAPÍTULO 4



Contents lists available at ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parint

Short communication

Apparent dominance of the G1–G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal

Sílvia Beato^{a,c,*}, Ricardo Parreira^b, Manuela Calado^a, Maria Amélia A. Grácio^a

^a Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas (UHMM)/Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM),

Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT)/Universidade Nova de Lisboa (UNL), Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

^b Unidade de Virologia/Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT)/Universidade Nova de Lisboa (UNL),

Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

^c Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Avenida empresário Campos Talagueira, 6000-767, Castelo Branco, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2010

Received in revised form 28 July 2010

Accepted 10 August 2010

Available online 19 August 2010

Keywords:

Echinococcus granulosus

Hydatid cyst

G1–G3 genotypes

Portugal

Mitochondrial DNA

ABSTRACT

Infection by the larval stage of the cestode *Echinococcus granulosus* causes a disease known as cystic echinococcosis or hydatidosis, which is one of the most widespread zoonotic infections of veterinary and medical importance. Numerous studies have shown that *E. granulosus* exists as a complex of strains differing in a wide variety of criteria. Ten distinct genotypes (G1–G10) have been identified with a potential impact on the pathology, epidemiology and the effect of the measures implemented for the control of hydatidosis. Our main objective was to carry out a preliminary analysis of the genotypes of *E. granulosus* circulating in the central inland region of Portugal.

Parasite samples (hydatid cysts, $n = 27$) were isolated from the liver and lung of sheep and cattle. The DNA extracted from protoscolexes isolated from the fertile cysts served as a template for the PCR amplification of the part of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*), ATP synthase F0 subunit 6 (*atp6*) as well as the large (*rmlL/16S*) and small (*rns/12S*) ribosomal RNA genes. Similarity searches with homologous sequences in the databanks indicated a very high similarity with references assigned to the G1, G3 and/or G1–G3 complex of *Echinococcus* strains. Phylogenetic analysis (Bayesian approach) supported these observations, and confirmed the assignment of all the analyzed sequences to the G1–G3 genetic cluster.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Cystic echinococcosis (also known as hydatidosis or hydatid disease) is one of the most important parasitic infections of livestock, and a considerable cause of morbidity and mortality in the world. This long known disease remains, still today, one of the most important helminthic zoonoses and is regarded as a significant worldwide public health problem [1]. Its etiological agent is a parasite known as *Echinococcus granulosus*. In its natural cycle this cestode has dogs and other canids as definitive hosts, whereas its larval stage (the metacestode) can be found in a number of ungulates including sheep, goats, horses and pigs. Accidentally, it can also be transmitted to a series of other mammals such as rodents, marsupials, non-human primates and humans [2]. Transmission to humans frequently results from close contacts with infected dogs carrying the parasite's eggs on their fur or, indirectly, as a result of ingestion of contaminated water or food [3].

The taxonomy and phylogeny of the genus *Echinococcus* have remained a controversial issue for several years [1]. A number of *E. granulosus* strains, designated G1 to G10 have been recognized [3,4], all of which appear to be adapted to particular life cycle patterns and host assemblages [5]. A high degree of genetic diversity between *E. granulosus* strains is one of this parasite's features. In recent years a number of molecular approaches have allowed a more thorough genetic characterization of the different *E. granulosus* strain types so far identified, and supported the elevation of two of them, formerly known as the G4 and G5 strains, to the species status (*E. equinus* and *E. ortleppi*, respectively) [4].

Recent epidemiological data regarding the frequency, geographic distribution, and host range of the *E. granulosus* genetic variants in Europe is lacking. Apart from its impact on the development of control strategies, this information also provides insights on the putative differential pathogenicity and growth characteristics of the parasite's genetic variants in humans, or their potential differences in response to therapeutics. All these reasons have prompted us to conduct this survey of *Echinococcus* genetic variants circulating in the central inland region of Portugal. Human and animal cystic echinococcosis cases have been previously reported in this region, previously defined as hyper endemic for *E. granulosus* infection [6] and an important public health problem.

* Corresponding author. Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas (UHMM)/Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT)/Universidade Nova de Lisboa (UNL), Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal. Tel.: +351 21 365 26 00x507; fax: +351 21 36321 05.
E-mail address: silvia.beato@ihmt.unl.pt (S. Beato).

A total of 58 hydatid cysts were collected from the lung (n=26) or liver (n=32) of sheep and cattle in a slaughterhouse servicing 5 different localities in central Portugal (Fig. 1). Thirty-one of these cysts, classified as infertile, calcified or contaminated (bacteria), were discarded. The remainder 27 (26 from sheep, 1 from cattle) fertile cysts were further processed. The genomic DNA from each fertile cyst was extracted from protoscolex preserved in 70% ethanol using the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche, Mannheim, Germany), as indicated by the supplier.

Amplification, by PCR, of the part of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene (*cox1*) was carried out using the

previously described JB3 and JB4.5 primers and reaction conditions [7]. A multiple sequence alignment of complete mitochondrial DNA sequences from a total of 17 different *Echinococcus* strains (listed in Fig. 3), and assigned to 8 different species, was constructed with MAFFT vs. 6 [8] using sequence data obtained from the public databases (GenBank/EMBL/DBJ). It served as a starting point for the design of pairs of oligonucleotides allowing the amplification of parts of the ATP synthase F0 subunit 6 (*atp6*) as well as the large (*rml/16S*) and small (*rms/12S*) ribosomal RNA genes. The primers used were as follows: *atp6* (ATP6F: 5'-AAACTGTRGGGTTTCATGTCYC-3' and ATP6R: 5'-CACAACTAAAAGGAAAYAAACCAAC-3'), *rms* (12SrF: 5'-

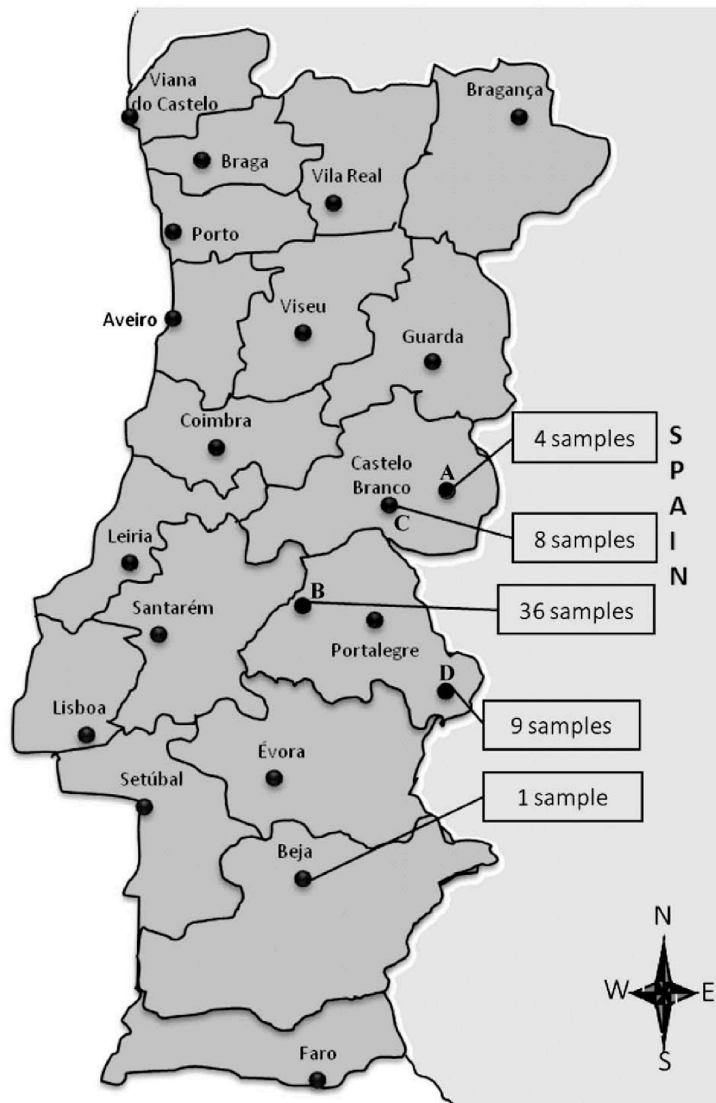


Fig. 1. Map of Portugal showing the geographic origin and number (indicated by the rectangles) of the *Echinococcus granulosus* strains analyzed in this study. The localities indicated by the letters A–D (A–Idanha-a-Nova, B–Ponte de Sor, C–Castelo Branco, and D–Elvas) represent the origin of the infected animals from which *Echinococcus* mitochondrial sequences were obtained.

GGTTTATTTCCTTTTGCATCATGC-3' and 12SrR: 5'-CCTAAGTCAA-CATCGAGGTGGCAAAC-3', and *rnmL* (16SrF: 5'- AGCCAGGTCGGTCT-TATCTATG-3' and 16SrR: 5'- CGAGGGTGACGGGCGGTGTGTAC-3'). For these 3 genes, PCR conditions included an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 45 s, 61 °C for 1 min and 72 °C for 45 s, followed by a final extension for 7 min. In all cases 0.6 μM was the final concentration of primers used per reaction carried out with the Illustra™ puReTaq Ready-to-go PCR beads' system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The obtained PCR amplicons were purified from the reaction mixtures using the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Valencia, USA), and directly

sequenced. Nucleotide sequence similarity searches were carried out using BLASTn (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Phylogenetic inference was based on a Bayesian Markov chain Monte Carlo approach, run for 6×10^6 generations under a GTR model, using MrBayes v3.0b4 [9], with a nucleotide rate heterogeneity estimated using a γ distribution for the variable sites. The nucleotide sequences reported in this study were deposited at the EMBL/GenBank/DDBJ sequence databases under accession numbers FN646353-FN646362, FN646364-FN646378, FN666904 and FN666905 (*cox1*), FR668537-FR668555 (*atp6*), FR666874-FR666903 (*rnmL*) and FR667922-FN667949 (*rns*).

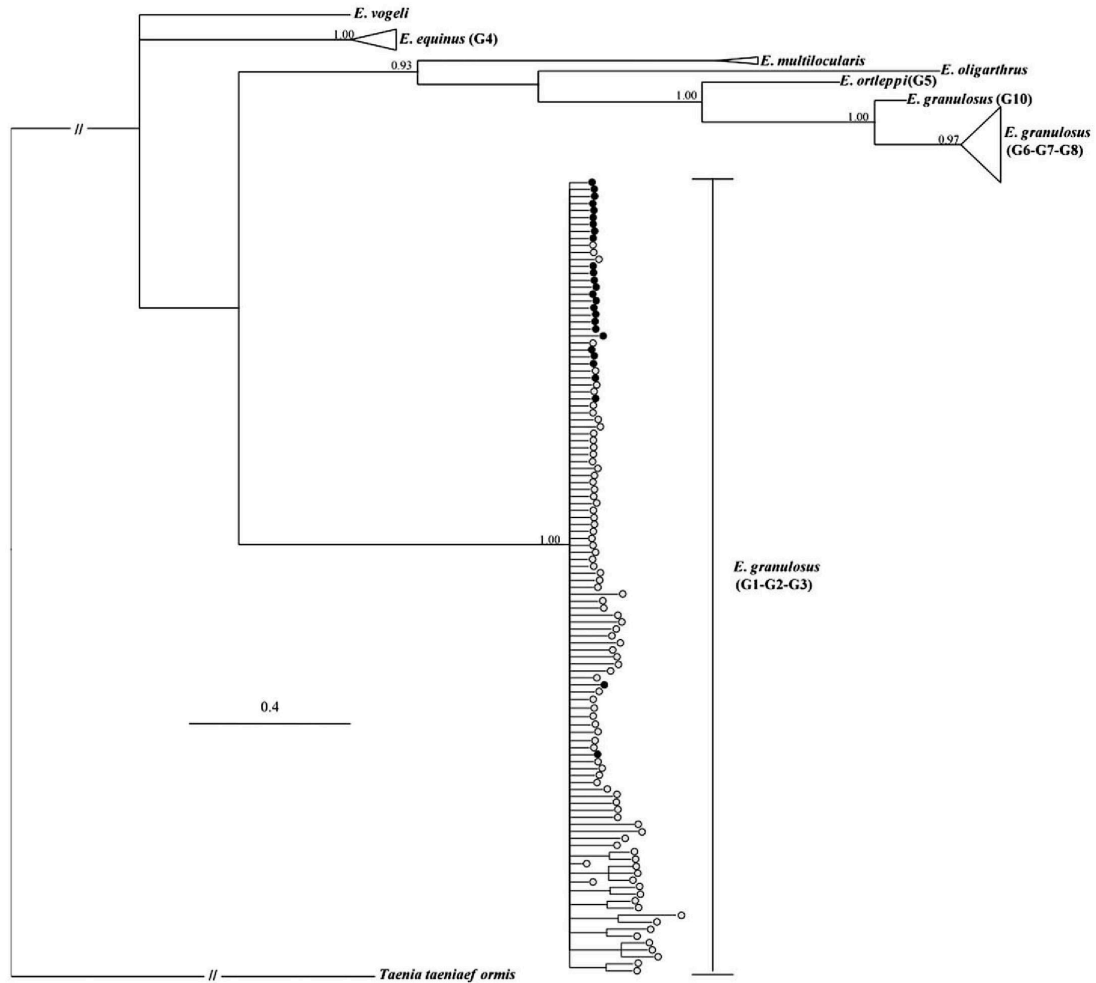


Fig. 2. Phylogenetic tree (Bayesian analysis) generated from the analysis of partial *Echinococcus cox1* sequences. Branch lengths are proportional to the number of nucleotide changes per site. At selected branch nodes, the numbers indicate the values of Bayesian probability. The sequences obtained from the Portuguese strains of *E. granulosus* are indicated by the black circles. The tree was rooted using a *Taenia taeniaeformis* (AB221484) as the outgroup sequence. The different *Echinococcus* references (species and accession numbers) used in this analysis, indicated by the grey circles, were as follows: *E. multilocularis* – M84669, M84668; *E. equinus* – AJ508035, AJ508036, EF143834, and M84664; *E. oligarthrus* – M84671; *E. ortleppi* – M84665; *E. granulosus* G10 – AF525457; *E. granulosus* G6–G7–G8 cluster – AB271910, AB271911, AB271912, AB271236, AB274020, DQ062858, DQ341580, DQ341582, DQ341584, DQ856468, EU151431, M84666, and M84667; *E. granulosus* G1–G2–G3 cluster – AB033407, AB458672, AB458673, AB458674, AB458675, AB470527, AJ508013, AJ508019, AY278068, AY679144–AY679146, AY686559, AY850565, DQ062857, DQ109036, DQ131582, DQ269943, DQ269947, DQ333185, DQ341564, DQ341566, DQ341568, DQ341579, DQ356881, DQ356882, DQ356883, DQ856466, DQ856467, EF367241–EF367266, EF367269, EF367270, EF367271, EF367273–EF367276, EF367292, EF367294, EF393619, EF545563, EF595654, EU006775, EU006776, EU006781, EU006784, EU072107, EU072108, EU072110, EU178103, EU178105, EU503084, EU929083, FJ608720, FJ608726, FJ608749, FJ608759, FJ608760, M84661, M84662, M84663, U50464, and U50464.

Since it evolves more rapidly than nuclear DNA, mitochondrial genes have, a priori, the potential to resolve phylogenetic and taxonomic problems regarding the analysis of closely related taxa. Furthermore, the large ensemble of data already available in the databases have led us to initiate this study with the analysis of *cox1*, one of the most extensively studied mitochondrial genes. A specific DNA segment amplified, and sequenced from the 27 fertile cysts, revealed almost total nucleotide sequence conservation, as polymorphisms were only found at two of the positions analyzed. Similarity searches with sequences deposited in the public databases (n>380) revealed over 99% identity (10 best matches) with partial *cox1* sequences. Most of these were referred to as having been amplified from either sheep or cattle, and only one was referred to as originating from a water buffalo (DQ104331). The overwhelming majority of them was classified as G1 (the common sheep strain), or included in a G1–G3 complex. Similar results were obtained for the *atp6*, *rns* and *rml* sequences (data not shown).

The relationships between the sequences here described, and several other references deposited in the databases, were also carried out through phylogenetic reconstruction using a Bayesian approach. In a preliminary analysis involving only the *cox1* sequences (due to their wide representation in the sequence databases), and contrary to what had been previously reported [4], *E. vogeli* and *E. equinus* (not *E. oligarthus*) occupied basal positions in the obtained phylogenetic tree (Fig. 2). However, these differences may be explained by the non-overlapping data sets used

(considerably shorter in the analysis presented here). The G6 to G10 strains formed a monophyletic cluster supported by maximum posterior probability. The tight segregation of these strains in phylogenetic trees has previously prompted the assignment of all these variants to a single species, designated *E. canadensis* [10]. Nevertheless, the analysis here presented revealed a clear separation between the G10 strain and a very tight G6–G7–G8 cluster of reference sequences, which warrants further investigation.

The study of *Echinococcus* strains obtained from Portuguese animals was further extended with the analysis of partial *atp6*, *rml* and *rns* sequences. While the amplification of *atp6* was only possible for a total number of 19 samples due to exhaustion of the available material and/or its degradation, we were able to amplify ribosomal DNA segments from the 27 samples from which *cox1* sequences had been previously obtained. For that reason, the assessment of phylogenetic relationships between *Echinococcus* strains, graphically depicted in Fig. 3, was based on the construction of Bayesian trees involving the analysis of separate *atp6* (Fig. 3A, 575 aligned nucleotides) and *cox1/rns/rml* (Fig. 3B, 1703 aligned nucleotides) concatenated sequence datasets. Both phylogenetic trees disclosed a congruent association between *E. ortleppi* (G5) and a cluster including *E. canadensis* (G6–G8), as well as the inclusion of all the Portuguese sequences analyzed in a statistically consistent cluster with low genetic variability, and containing the two *E. granulosus* references used. The larger size of the *cox1/rns/rml* concatenated dataset also allowed a better segregation of the major clusters of sequences, while

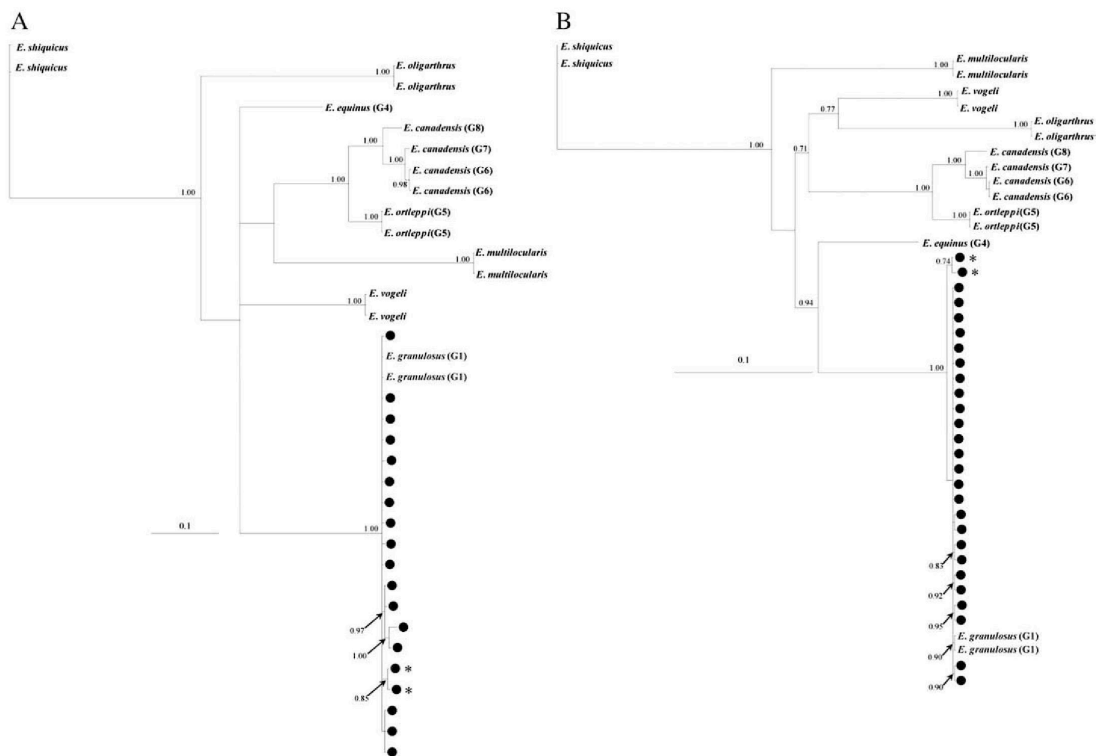


Fig. 3. Bayesian phylogenetic tree of partial mitochondrial *Echinococcus atp6* (A) and *cox1/rns/rml* concatenated sequences (B). Branch lengths are proportional to the number of nucleotide changes per site. At selected branch nodes, the numbers indicate the values of Bayesian posterior probability which were considered significant (> 0.80). In both trees a similar set of reference sequences was used, which included *E. shiquicus* (NC_009460 and AB208064), *E. multilocularis* (NC_000928 and AB018440), *E. vogeli* (NC_009462 and AB208546), *E. oligarthus* (NC_009461 and AB208545), *E. canadensis* (NC_011121, AB208063, AB235847, and AB235848), *E. ortleppi* (NC_011122 and AB235846), *E. equinus* (AF346403) and *E. granulosus* (NC_008075 and AF297617).

in the *atp6* tree a polytomy excluded only the *E. shiquicus* and *E. oligarthrus* references. Curiously, in the *cox1/rrnS/rrnL* tree (Fig. 3B) two sequences (indicated by *), clustering together with statistical support, segregate prematurely from all the others included in the *E. granulosus* group. Although the topology of the *atp6* tree is not exactly congruent, these two sequences still cluster within the *E. granulosus* radiation with significant statistical support (Fig. 3A). Curiously, the *cox1* fragment of both sequences had high similarity (BLAST analysis) with the water buffalo (G3) *Echinococcus* strain DQ104331 mentioned above.

The G1 variant, also known as the common sheep strain, is the most important *E. granulosus* strain in Europe. In the Mediterranean region in particular, where sheep farming is extensive, its presence coincides with the highest levels of human cystic echinococcosis [3,11]. Nevertheless, the G3 strain, which is considered a poorly characterized genetic variant that infects buffaloes and cattle, has already been described in Greece and Italy [13,14]. The available genetic data has been disclosing a high degree of similarity between these two strains (G1/G3), which can also be extended to G2, or the Tasmanian sheep strain. This has led several authors to suggest the inclusion of the G1, G2 and G3 strains into a single species designated *E. granulosus sensu stricto* [4,11,12]. The analysis here presented also supports this suggestion. Indeed, all the *cox1* sequences analyzed clustered with a posterior probability of 1.00 in a cluster, which contained all the G1 to G3 references used in this study (n = 88). The short sequence analyzed most certainly impacts the low genetic variability observed and the consequent uncertain resolution of this cluster. However, even the analysis of a larger sequence resulting from the concatenation of several mitochondrial genes has not unambiguously improved the resolution of the G1 to G3 strains [4] which is clearly restricted by the paucity of sequence data for mitochondrial markers from G2–G3 *Echinococcus* strains.

Although the analysis here presented involved a small number of *Echinococcus* samples, it is the first genetic characterization of the parasite carried out in Portugal. The assessment of the genetic diversity of the *Echinococcus* strains circulating in the central inland part of the country disclosed an apparent dominance of the G1–G2–G3 cluster (well defined in the *cox1* tree, Fig. 2). An extended study of the parasite's genetic makeup, involving the examination larger set of

Echinococcus strains and additional mitochondrial (*nad1* and *cytB*) and nuclear markers (*cal*, *mdh*, and *act11*) is currently being undertaken.

Acknowledgements

We would thank the animal health officials Dr. Barreira Junior, Dra. Ana Maria Menezes, Dra. Maria Otilia Reis and Dr. Henrique Domingues, for their cooperation in this study. This study was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) through UPMM funding.

References

- [1] Thompson RC. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol* 2008;119:439–46.
- [2] Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:107–35.
- [3] Romig T. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg* 2003;388: 209–17.
- [4] Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 2007;134:713–22.
- [5] McManus D, Thompson RCA. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 2003;127:S37–51.
- [6] David De Moraes JA A. *Hidatidologia Em Portugal*. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1998. (In Portuguese).
- [7] Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 1992;54: 165–73.
- [8] Katoh K, Toh H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform* 2008;9:286–98.
- [9] Huelsenbeck JP, Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001;17:754–5.
- [10] Lavikainen A, Lehtinen MJ, Laaksonen S, Agren E, Oksanen A, Meri S. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology* 2006;133:565–70.
- [11] Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int* 2006;55:187–91.
- [12] Thompson RCA, Lymbery AJ, Constantine CC. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 1995;35:145–76.
- [13] Capuano F, Rinaldi L, Maurelli MP, Perugini AG, Veneziano V, Garippa G, et al. Cystic echinococcosis in water buffaloes: epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains. *Vet Parasitol* 2006;137:262–8.
- [14] Varcasia A, Canu S, Kogkos A, Pipia AP, Scala A, Garippa G, et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitol Res* 2007;101:1135–9.

CAPÍTULO 5

***Echinococcus granulosus* em Portugal: primeira evidência do genótipo G7 em gado bovino**

Este capítulo corresponde ao artigo publicado em revista de circulação internacional com arbitragem científica:

Beato, S., Parreira, R., Roque, C., Gonçalves, M., Silva, L., Maurelli, M.P., Cringoli, G., Grácio, M.A. (2013). ***Echinococcus granulosus* in Portugal: The first report of the G7 genotype in cattle.** *Veterinary Parasitology*, 198 (1-2), 235-239.

Resumo

Embora a hidatidose/equinococose continue a ser reconhecido como um problema de Saúde Pública em Portugal, os dados moleculares em relação aos tipos e prevalência de infecção de estirpes de seu agente etiológico (*Echinococcus granulosus*) ainda são escassos.

Ao longo dos últimos anos temos vindo a avaliar a prevalência da CE no país, e neste artigo foram determinados os genótipos do parasita que infectam ovinos, caprinos, bovinos e humanos, em Portugal, com base em 209 quistos hidáticos provenientes de fígado (n = 96), pulmão (n = 95), pâncreas (n = 17) e rim (n = 1), amostras estas que foram obtidas entre 2007 e 2011. Protoescólices ou membranas germinativas foram recolhidas a partir de quistos individuais, o DNA foi extraído, e uma parte desse DNA que codifica o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 foi amplificado por PCR.

No geral, os resultados confirmam o domínio global do cluster G1-G3 de *E. granulosus*, que são particularmente prevalentes no Centro e Sul de Portugal, em ruminantes. Inesperadamente, uma sequência do parasita com origem num bovino encontrado corresponde ao genótipo de *E. granulosus* G7 (actualmente descrito como *E. canadensis*), aqui relatada pela primeira vez em bovinos, e em Portugal.

Palavras-chave: *Echinococcus granulosus*; Portugal; genótipos; hospedeiros intermediários; citocromo oxidase mitocondrial



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

Echinococcus granulosus in Portugal: The first report of the G7 genotype in cattle



Sílvia Beato^{a,b,*}, Ricardo Parreira^c, Cláudio Roque^a, Matilde Gonçalves^a,
Liliana Silva^a, Maria Paola Maurelli^d, Giuseppe Cringoli^d,
Maria Amélia Grácio^b

^a Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Campus da Talagueira, 6000-767 Castelo Branco, Portugal

^b Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM), Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

^c Unidade de Microbiologia Médica (Grupo de Virologia), IHMT/UPMM/UNL, Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

^d Department of Veterinary Medicine and Animal Productions, University of Naples Federico II, Via della Veterinaria, 1, 80137 Naples, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2013

Received in revised form 23 July 2013

Accepted 17 August 2013

Keywords:

Echinococcus granulosus

Portugal

Genotypes

Intermediate hosts

Mitochondrial cytochrome oxidase

ABSTRACT

Although cystic echinococcosis (CE) has been a recognized public health problem in Portugal, molecular data regarding the types and prevalence of infecting strains of its etiological agent (*Echinococcus granulosus*) are still scarce. Over the last years we have been evaluating the prevalence of CE in the country, and in this report we determined the parasite genotypes infecting sheep, goats, cattle and human in Portugal, based on 209 hydatid cysts recovered from liver ($n=96$), lung ($n=95$), pancreas ($n=17$) and kidney ($n=1$) samples obtained between 2008 and 2011. Protoscoleces or germinal layers were collected from individual cysts, DNA was extracted, and a part of the mitochondrial DNA encoding the cytochrome c oxidase subunit 1 was amplified by PCR. Overall, the results confirm the overall dominance of the G1–G3 cluster of strains, which are particularly prevalent in southern Portugal in livestock ruminants. Unexpectedly, one parasite sequence with cattle origin was found to correspond to *E. granulosus* G7 genotype (also known as *E. intermedius*), here reported for the first time in bovine, in Portugal.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cystic echinococcosis (CE) caused by the metacystode of *Echinococcus granulosus*, is a zoonotic disease of worldwide importance that is widespread in Europe, and for that matter the Iberian Peninsula is no exception

(Casulli et al., 2013). In Portugal, the high prevalence of echinococcosis/hydatidosis especially in animals, but also reported in the human population, render it one of the most important parasitic zoonotic diseases in the country. Despite the fact that CE is a considerable veterinary health problem in Portugal, very little information is yet available about the parasite involved.

E. granulosus exists as a complex of genetic variants (strains) which evidence genotypic as well as phenotypic differences. These include intermediate host specificity, rate of development (Thompson and McManus, 2002), chemical composition of the cyst, and carbohydrate metabolism (McManus, 2009). However, based on

* Corresponding author at: Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Campus da Talagueira, 6000-767 Castelo Branco, Portugal. Tel.: +351 272340560; fax: +351 272340568.

E-mail addresses: silviabeato@ipcb.pt, silvia.beato@gmail.com (S. Beato).

the analyses of phylogenetic (nuclear and mitochondrial molecular markers), transmission and epidemiological data, some of the strains have been either referred to as different species (Thompson, 2008) or genotypes of a single species (McManus & Thompson, 2003; Nakao et al., 2007; Thompson, 2008). Each of these genotypes can successfully establish, and develop, fertile cysts (with protoscolexes) in specific intermediate hosts, such as sheep or pigs, mainly involving strains of the G1 and G7 genotypes, respectively (Eckert et al., 1993; Busi et al., 2007; Thompson, 2008; Schneider et al., 2010). Infection may not be restricted to the parasite's usual intermediate hosts, usually whenever a non-usual intermediate host is infected, the most frequent outcome is the production of infertile cysts (Thompson and McManus, 2002; Bružinskaitė et al., 2009). Furthermore, the G1 and G7 genotypes display a different geographic distribution and prevalence, G1 being the most prevalent, occurring worldwide, particularly in areas of extensive sheep farming (Thompson, 2008; Dybicz et al., 2013). Additionally, different *E. granulosus* genotypes have been associated with different development rates in the definitive host (Eckert et al., 1993; Eckert and Thompson, 1997). The G1 genotype (also known as sheep strain) can develop fertile cysts in sheep, but it can also infect cattle, pigs, goats, camelids, macropods, and humans. On the other hand, the G7 genotype has been mostly isolated from pigs and wild boars, and less frequently from humans (Thompson, 2008; Schneider et al., 2010) and cattle (Bružinskaitė et al., 2009). However, very little is still known about the factors that determine host specificity or developmental differences among different strains of this parasite (Thompson and McManus, 2002).

The phylogenetic relations within the G6–G10 group have not been totally resolved, and taxonomic assignments based on it are still under debate. This cluster, tentatively designated *E. canadensis*, was proposed to be divided into the two species: *E. canadensis* (G8/G10) and *E. intermedius* (G6/G7) (Nakao et al., 2010; Thompson, 2008; Moks et al., 2008; Thompson et al., 2006). While this proposal gained support from phylogenetic analyses based on nuclear markers (Saarma et al., 2009), mitochondrial marker-based phylogenies support a different clustering pattern, with *E. canadensis* (G6/G7/G10) forming a subgroup, of which *E. canadensis* (G8) is a closely related sister taxon (McManus, 2013; Nakao et al., 2013; Boubaker et al., 2013; Moks et al., 2008).

In a previous study, we reported the circulation of different genotypes (G1–G3 cluster) of *E. granulosus* in the central inland region of Portugal (Beato et al., 2010), but knowledge on the distributions of genetic variants of this parasite in other parts of the country are not currently known. Therefore, the aim of this study was to extend our analysis with a sampling coverage of most of the territory of continental Portugal, to assess the presence of the parasite in its intermediate host and characterize its genetic variants. The analysis of COI sequence data was chosen, as it represents the most extensively characterized *Echinococcus* mitochondrial marker, for which extensive datasets can be obtained from the public databases.

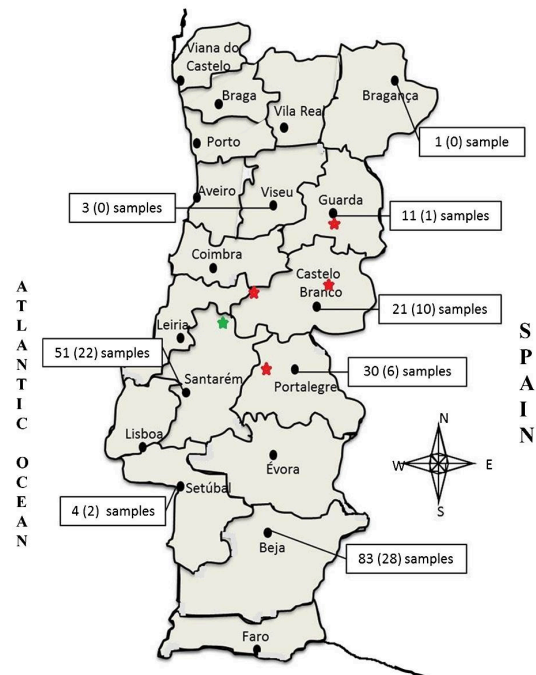


Fig. 1. Geographic origin, total number, and number of fertile samples (in brackets) of the *Echinococcus granulosus* strains analyzed in this study. District capitals are indicated.

2. Materials and methods

This report is based on the analysis of two hundred and eight animals [sheep (173), cattle (32), and goat (3)] and one human sample, collected between 2008 and 2011. The cysts were collected in 4 slaughterhouses (for which no ethics approval apply) and an hospital (Fig. 1). The latter was processed after an informed consent was obtained from the patient involved. Cysts, collected from the liver (sheep, cattle, and goat), pancreas (sheep), lung (cattle and sheep) and kidney (human), were rinsed in phosphate-buffer saline (PBS) and fixed in ethanol (100%), where they were kept until further use. Seventy-three fertile cysts were identified by microscopic identification of protoscolexes on a squash mount. One hundred and thirty-five of these cysts, classified as infertile, calcified or contaminated (bacteria) were discarded from our analysis.

Genomic DNA was extracted from 74 fertile cysts with the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche, Mannheim, Germany), as indicated by the supplier, and stored at -20°C . Fragments of the mitochondrial COI (cytochrome oxidase subunit I) gene were amplified from the 74 DNA extracts as described by Bowles and McManus (1993), using the JB3/JB4.5 primers. We also analyzed three samples from Italy and one from Brazil, which were kindly made available by Dr. M. P. Maurelli (University of Naples Federico II, Naples, Italy) and Dr. R. Rodrigues e Silva (Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil), respectively. These strains had never

been genetically analyzed before. PCR amplification was performed with the Illustra™ puReTaq Ready-to-go PCR beads' system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), using 0.6 μ M of each primer in a 25 μ l volume. Thermal PCR profiles included 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 55 °C and 45 s at 72 °C, and finally 10 min at 72 °C. The PCR products were separated on agar gel (1%) stained with ethidium bromide. The obtained PCR amplicons were directly purified from the reaction mixtures using the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Valencia, USA), and directly sequenced. Nucleotide sequence similarity searches were carried out using BLASTn (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Phylogenetic relationships were inferred from nucleotide sequences aligned with MAFFT vs. 6 (care was taken so as to maintain codon alignment), using the evolutionary model indicated by jModeltest (Posada, 2008), and defined with Akaike information criterion (GTR+I+ Γ). The viral reference sequences used were downloaded from the public databases. Phylogenetic trees were constructed using MrBayes v3.0b4 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), and consisted of 20×10^6 generations starting from a random tree and four Markov chains with default heating values sampled every 100th generation. The first 10% sampled trees were discarded (burn-in). To prevent reaching only apparent stationarity, two separate runs were conducted for each analysis. All the COI sequences determined in the course of this study have been deposited in the EMBL/GenBank/DDJB public databases under accession numbers FN646353–FN646378, FR666904–FR666905 and HF947552–HF947598.

3. Results and discussion

Despite the fact that a wide range of *E. granulosus* intermediate hosts have been described in Portugal, a country where CE is considered endemic, relatively little information is available on the characterization of the circulating strains of this parasite. In 2010, in Portugal, the presence of an apparently dominant G1–G3 cluster of the pastoral or livestock strains of *E. granulosus sensu stricto* was found circulating in the country (Beato et al., 2010), while a more recent report (Guerra et al., 2012), described the presence of the G7 genotype in wolves, one of the parasite's definitive host. However, to the present day, the literature makes no reference to the presence of G7 strains in any of the parasite's intermediate hosts.

The amplification of a portion of the gene encoding the subunit 1 of the mitochondrial cytochrome oxidase (COI) with JB3/JB4 (Bowles and McManus, 1993) yielded a DNA fragment of approximately 450bp from all the samples under study. Analyses of the obtained sequences by both BLAST and phylogenetic inference, revealed that the great majority of them showed high sequence identity to *E. granulosus* references, and segregated in a major monophyletic group with high posterior probability, corresponding to the so-called G1–G3 cluster. Taking into account our previous report, restricted to the analysis of parasite sequences amplified from fertile cysts collected in slaughterhouses located in the center of Portugal (Beato et al., 2010), our results were not, altogether unexpected. Furthermore, and

since our analyses have been based on cyst collections mostly from sheep and cattle origin, it would not be unexpected to find a different *E. granulosus* strain distribution if extensive sampling had included, for example, samples of swine/cervid origin. Nevertheless, they clearly demonstrate that rather than being geographically confined, the G1–G3 radiation is widely dispersed in the country, being the overall dominant *E. granulosus* genetic cluster in cattle and pastoral animals (sheep/goat). Taking into account the fact that the analysis performed was limited to a portion of the COI coding sequence, the G1–G3 cluster was characterized by overall low genetic variability, suggesting possible widespread genetic exchanges due to highly mobile intermediate and definitive hosts, the later most probably being dogs. Regardless of their genetic origin (Portugal, Italy, Brazil), the *E. granulosus* sequences formed consistent (with statistical support) epidemiological relevant clusters. While our previous study involved the characterization of *E. granulosus* strains exclusively from sheep, in the current report we analyzed parasite sequences from multiple origins (sheep, cattle, goats, and a human). The overwhelming majority (93.2%, 41/44) of the sheep fertile samples were taken from livers, while most (53.6%, 15/51) of the cattle fertile cysts were collected from infected lung tissue.

A recent, and thorough, epidemiological analysis focusing on the frequency, geographic distribution, and host range of the *E. granulosus* genetic variants in Europe is still not available. This lack of information is of considerable importance, as it limits the possibility for development of strategies to control the parasite. Moreover, it would provide insights on the putative differential pathogenicity and growth characteristics of its genetic variants, or their potential distinctiveness in response to therapeutics. Although Portugal is referred to in the literature as an hyperendemic region for CE (Rojo-Vazquez et al., 2011), the numbers notifying human infections (average of 2.2 per 100,000 inhabitants/year) suggest it should, in fact, be considered hypoendemic for this disease (Eckert et al., 2001). Nevertheless, the distribution of cases is not homogeneous, and in the southern part of the country (Alentejo region, including the districts of Beja, Évora, Portalegre, Santarém, and Setúbal) human infection is more common, and qualifies as being hyperendemic (Morais, 2007). Here, the risk of infection of the rural populations is high, especially because these individuals still rely on animal husbandry for personal sustenance. Our data are in accordance with this distribution. Although we could not obtain any samples from the district of Évora, a large number of fertile cysts were, indeed, collected in the Alentejo, especially in Beja and Santarém.

Despite the countrywide dominance of *E. granulosus* G1–G3 strains in ruminants, unexpectedly one of the sequences analyzed (V150) was found to segregate not with *E. granulosus sensu stricto* but within the *E. canadensis* G6–G10 complex with high statistical support (Fig. 2). This sequence was found to be highly homologous (99% identity) to, and segregated in the obtained phylogenetic tree with, a pig strain classified as G7 (AB235847), previously described by Nakao and collaborators (2007). To our knowledge, this is the first report of the occurrence of a G7 strain in a bovine (intermediate host), in Portugal. As previously

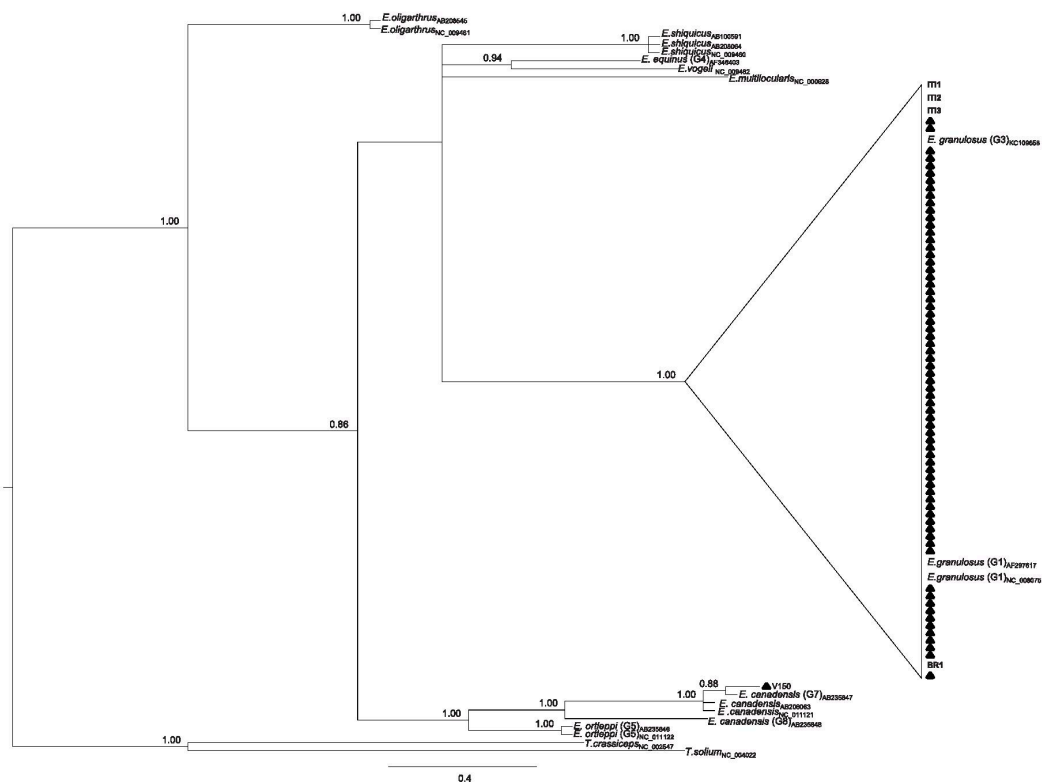


Fig. 2. Phylogenetic tree (Bayesian analysis) generated from the analysis of partial *Echinococcus* COI coding sequences. Branch lengths are proportional to the number of nucleotide changes per site. At selected branch nodes, the numbers indicate the values of Bayesian posterior probability >0.85. The sequences obtained from the Portuguese strains of *E. granulosus* are indicated by triangles. The tree was rooted by a monophyletic cluster formed by *Taenia crassiceps* (NC_002547) and *T. solium* (NC_004022) as the outgroup. The different *Echinococcus* references (species and accession numbers) used in this analysis are also indicated. The putative *E. granulosus* G7 sequence identified is indicated by V150. IT1–3 and BR1 indicate the Italian and Brazilian (respectively) G1–3 *E. granulosus* strains included in this analysis. All the COI sequences determined in the course of this study have been deposited in the EMBL/GenBank/DBJ public databases under accession numbers FN646353–FN646378, FR666904–FR666905 and HF947552–HF947598.

mentioned, the nomenclature of the *E. canadensis* group (G6–G10) is still open to debate, and within this group the G6–G7 strains have been reported as *E. intermedius* (McManus, 2013; Thompson, 2008). To avoid controversy, in this report the G7 sequence is referred to as *E. canadensis* in line with molecular epidemiology studies that suggest this designation for the G6–G10 complex (Piccoli et al., 2013; Saarma et al., 2009; Thompson et al., 2006; Romig et al., 2006). *E. canadensis* is well established, and frequent, in a contiguous area of eastern–central Europe that includes many countries such as Poland, Slovakia, Ukraine, Germany, Spain, Italy, Greece, Romania, and Lithuania (Beyhan and Umr, 2011; Snábel et al., 2009). It also has been described in Armenia, Argentina, Peru, and Mexico (Casulli et al., 2013). In our study, we found this *E. canadensis* strain in a biological sample collected near Lisbon, which alerts to the fact that transmission of *Echinococcus* G7 may be occurring nearby (district of Setúbal, region of Palmela). Despite previous reports assigning low human infectivity to G7 strains, recent studies from central Europe have described humans infected with this parasite strain (Piccoli et al., 2013; Dybicz et al., 2013). In view of the latter, and taking

into account that a G7 strain was found in the vicinity of the largest urban center in Portugal, where ruminant husbandry occurs extensively, such finding may underlay an increased public health concern, as accidental transmission G7 strains to humans, from either their definitive or intermediate hosts, may occur.

References

Beato, S., Parreira, R., Calado, M., Grácio, M.A., 2010. Apparent dominance of the G1–G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal. *Parasitol. Int.* 59, 638–642.
 Beyhan, Y.E., Umr, S., 2011. Molecular characterization and prevalence of cystic echinococcosis in slaughtered water buffaloes in Turkey. *Vet. Parasitol.* 181, 174–179.
 Boubaker, G., Macchiaroli, N., Prada, L., Cucher, M.A., Rosenzvit, M.C., Ziadinov, I., Deplazes, P., Saarma, U., Babba, H., Gottstein, B., Spiliotis, M., 2013. A multiplex PCR for the simultaneous detection and genotyping of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2017.
 Bowles, J., McManus, D.P., 1993. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int. J. Parasitol.* 23, 969–972.
 Bružinskaitė, R., Šarkūnas, M., Torgerson, P.R., Mathis, A., Deplazes, P., 2009. Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Vet. Parasitol.* 160, 237–241.

- Busi, M., Šnāibel, V., Varcasia, A., Gariippa, G., Perrone, V., de Liberato, C., D'Amelio, S., 2007. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet. Parasitol.* 150, 75–83.
- Casulli, A., Interisano, M., Sreter, T., Chitimia, L., Kirkova, Z., La Rosa, G., Pozio, E., 2013. Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infect. Genet. Evol.* 12, 377–383.
- Dybiz, M., Gierczak, A., Dabrowska, J., Rdzanek, L., Michalowicz, B., 2013. Molecular diagnosis of cystic echinococcosis in humans from central Poland. *Parasitol. Int.* 62, 364–367.
- Eckert, J., Thompson, R.C., 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop.* 64, 19–34.
- Eckert, J., Thompson, R.C., Lymbery, A.J., Pawłowski, Z.S., Gottstein, B., Morgan, U.M., 1993. Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. *Parasitol. Res.* 79, 42–48.
- Eckert, J., Gemmel, M.A., Meslin, F.-X., Pawłowski, Z.S., 2001. *Who/Oie Manual On Echinococcosis In Humans And Animals: A Public Health Problem Of Global Concern*. World Organisation For Animal Health, Paris.
- Guerra, D., Armua-Fernandez, M.T., Silva, M., Bravo, I., Santos, N., Deplazes, P., de Carvalho, L.M., 2012. Taeniid species of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in Portugal with special focus on *Echinococcus spp.* *Int. J. Parasitol.* 2, 50–53.
- McManus, D.P., 2009. Reflections on the biochemistry of *Echinococcus*: past, present and future. *Parasitology* 136, 1643–1652.
- McManus, D.P., 2013. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology* 11, 1–7.
- McManus, D.P., Thompson, R.C., 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127, S37–S51.
- Moks, E., Jøgisalu, I., Valdmann, H., Saarma, U., 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of genotypes G5–G10. *Parasitology* 135, 647–654.
- Morais, J.A.D., 2007. Hidatidose humana: estudo clínico-epidemiológico no distrito de Évora durante um quarto de século. *Acta Med. Port.* 20, 1–10.
- Nakao, M., McManus, D.P., Schantz, P.M., Craig, P.S., Ito, A., 2007. *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134, 713–722.
- Nakao, M., Yanagida, T., Okamoto, M., Knapp, J., Nkouawa, A., Sako, Y., Ito, A., 2010. State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infect. Genet. Evol.* 10, 444–452.
- Nakao, M., Yanagida, T., Konyaev, S., Lavikainen, A., Odnokurtsev, V.A., Zaikov, V.A., Ito, A., 2013. Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology* 4, 1–12.
- Piccoli, L., Bazzocchi, C., Brunetti, E., Mihaiulescu, P., Bandi, C., Mastalier, B., Cordos, I., Beuran, M., Popa, L.G., Meroni, V., Genco, F., Cretu, C., 2013. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in south-eastern Romania: evidence of G1–G3 and G6–G10 complexes in humans. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 578–582.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.
- Rojo-Vazquez, F.A., Pardo-Lledias, J., Francos-Von Hunefeld, M., Cordero-Sanchez, M., Alamo-Sanz, R., Hernandez-Gonzalez, A., Brunetti, E., Siles-Lucas, M., 2011. Cystic echinococcosis in Spain: current situation and relevance for other endemic areas in Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e893.
- Romig, T., Dinkel, A., Mackenstedt, U., 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol. Int.* 55, S187–S191.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Saarma, U., Jøgisalu, I., Moks, E., Varcasia, A., Lavikainen, A., Oksanen, A., Simsek, S., Andresiuk, V., Denegri, G., González, L.M., Ferrer, E., Gárate, T., Rinaldi, L., Maravilla, P., 2009. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology* 136, 317–328.
- Schneider, R., Gollackner, B., Schindl, M., Tucek, G., Auer, H., 2010. *Echinococcus Canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 871–874.
- Šnāibel, V., Altintas, N., D'Amelio, S., Nakao, M., Romig, T., Yolasigmaz, A., Gunes, K., Turk, M., Busi, M., Hüttner, M., Sevcová, D., Ito, A., Altintas, N., Dubinský, P., 2009. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol. Res.* 105, 145–154.
- Thompson, R.C.A., 2008. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp. Parasitol.* 119, 439–446.
- Thompson, R.C., McManus, D.P., 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.* 18, 452–457.
- Thompson, R.C., Boxell, A.C., Ralston, B.J., Constantine, C.C., Hobbs, R.P., Shury, T., Olson, M.E., 2006. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. *Parasitology* 132, 439–447.

CAPÍTULO 6

Avaliação das relações filogenéticas existentes entre os genótipos de *Echinococcus* circulantes em Portugal

6.1. Introdução

A hidatidose é uma zoonose causada pelo estadio larvar do céstode *Echinococcus granulosus*. Esta afeta anualmente um elevado número de humanos e animais, causando sérios problemas económicos e de saúde, devido a migrações e mau controlo sanitário dos animais (Andresiuk *et al.*, 2013, Sharma *et al.*, 2013, Craig *et al.*, 2007). Portugal é caracterizada pela OMS como um país hiper-endémico em que esta doença é um problema de Saúde Pública (OMS, 2002), ainda que nos últimos anos apenas a zona do Alentejo esteja indicada como hiper-endémica (David Morais, 2010). A extensa variação intraespecífica no *E. granulosus* está associada com a mudança do ciclo de vida doméstico e silvático, a especificidade do hospedeiro, distribuição geográfica, dinâmica de transmissão, infecciosidade para os humanos, antigenicidade e sensibilidade a agentes quimioterapêuticos (Sharma *et al.*, 2013, Romig, 2003, Thompson e McManus, 2002).

A caracterização genética do género *Echinococcus* veio auxiliar o desenvolvimento de estudos epidemiológicos mais robustos. Estes demonstraram que a prevalência da hidatidose em geral varia em função do tipo de hospedeiro analisado, particularmente envolvendo os diferentes genótipos de *E. granulosus s.s.*. No caso dos seres humanos tem sido discutida a sua susceptibilidade à hidatidose, sendo expectável de que esta dependa não só de determinantes genéticos das populações humanas, mas também do genótipo de *E. granulosus* (Nakao *et al.*, 2007). Os níveis de variabilidade genética e as relações filogenéticas dentro e entre genótipos de *E. granulosus* têm implicações importantes para a segurança e desenvolvimento de programas eficientes de controlo de doenças, assim como para o desenvolvimento de programas de controlo de custos no domínio da pecuária (Andresiuk *et al.*, 2013).

A classificação do género *Echinococcus* tem sido controversa durante largas décadas devido às pequenas alterações existentes nas características morfológicas dos diferentes genótipos, descritores taxonómicos inadequados e falta de provas para a segregação geográfica ou ecológica (McManus, 2013; Thompson e McManus, 2002). Na verdade, e principalmente com base em estudos de DNA mitocondrial, foi mostrado que o *E. granulosus* compreende dez genótipos diferentes (G1 a G10), que tinha sido dividido em espécies distintas, compreendendo *E. granulosus sensu stricto* (G1, G2 e

G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5) e *E. canadensis* (G6, G7, G8, G9 e G10) (Nakao *et al.*, 2007). Hüttner *et al.* (2008) propuseram uma outra espécie *E. felidis*, que foi posicionada como um taxon irmão de *E. granulosus s.s.* (McManus, 2013). Esses estudos indicaram que o complexo *E. granulosus* não é monofilético, mas parafilético (Knapp *et al.*, 2011, Nakao, 2007), enquanto a análise de genes nucleares apenas sugere que o complexo *E. granulosus* seja monofilético (Sharma *et al.*, 2013, Saarma *et al.*, 2009). A classificação dos genótipos do complexo G6-G10 ainda é ambígua, sendo a nomenclatura de *E. canadensis* a mais aceite. A revisão taxonómica para unificar estirpes de *Echinococcus* específicas de cervídeos, camelos e porcos numa única espécie, *E. canadensis*, tem sido sugerida (McManus, 2013, Moks *et al.*, 2008, Nakao *et al.*, 2007). Foram realizados alguns estudos que sugeriram que o complexo *E. canadensis* deve ser dividido em duas espécies, *E. canadensis* (G8 / G10) e *E. intermedius* (G6 / G7) (Ito *et al.*, 2014, Nakao *et al.*, 2013, Boubaker *et al.*, 2013, Thompson, 2008). Esta proposta ganhou maior apoio nas análises filogenéticas baseadas no estudo das sequências de diferentes marcadores nucleares (Saarma *et al.*, 2009), mas as análises de filogenia do genoma mitocondrial contradizem essa suposição, mostrando que os genótipos G6, G7, G10 formam um subgrupo e o genótipo G8 é um taxon irmão (Moks *et al.*, 2008).

Os genótipos do complexo de espécies *E. granulosus s.s.* podem ser diferenciados pela composição das sequências de nucleótidos dos marcadores mitocondriais utilizados (subunidade 1 da nad-desidrogenase, subunidade 1 da citocromo oxidase C e a subunidade 6 da ATP sintase F0). Esta informação foi transmitida em alguns estudos, mas a diferença entre o complexo de espécies *E. granulosus s.s.* é pequena (McManus, 2013, Rinaldi *et al.*, 2008) e alguns autores referem que entre G2 e G3 não há diferenças, pelo menos no gene NADH (Casulli *et al.*, 2008), no entanto são relatadas algumas diferenças no gene COI (Pednekar *et al.*, 2009). Numa tentativa de detecção e discriminação dos genótipos do complexo G1-G3, em 2009, um grupo italiano otimizou a técnica de PCR em tempo real, utilizando como base o gene ribossomal 12S, que indicava pequenas diferenças nas temperaturas de desnaturação da dupla cadeia de DNA entre o genótipo G1 e G2/G3. Estes resultados foram importantes pois conseguiram separar o genótipo G1 dos outros dois pertencentes a este complexo, mas não resolveu por inteiro a diferenciação do complexo (Maurelli *et*

CAPÍTULO 6

al., 2009). Foram também utilizadas outras técnicas de biologia molecular para tentar demonstrar esta diferenciação como o RAPD-PCR, utilizado em amostras de diferentes hospedeiros intermediários, não tendo sido possível esta diferenciação genética (Taha, 2012). Ao comparar, utilizando o BLASTn, os amplicões obtidos em diversos estudos com as sequências de referência depositadas no GenBank, é possível identificar inequivocamente todas as espécies/genótipos pertencentes ao complexo *E. granulosus s.s.*, mas dentro do complexo, é difícil identificar as diferenças entre os genótipos G1, G2 e G3.

As hipóteses filogenéticas defendidas actualmente foram alargadas com base nas informações obtidas a partir da sequenciação completa do genoma mitocondrial, contudo é importante estudar os genes nucleares, como fonte alternativa de conhecimento. Sabe-se que o DNA mitocondrial dá informações importantes quanto à filogenia das espécies, contudo é, geralmente, haploide, apresenta cópias múltiplas e dá acesso a vários genes onde não ocorre recombinação (Saarma *et al.*, 2009). É importante referir que com base na análise do genoma mitocondrial foi possível diferenciar as espécies neotropicais *E. oligarthrus* e *E. vogeli* (Santos *et al.*, 2012). Estes genes parecem apresentar uma “rápida” evolução (Brown, 1983, Brown *et al.*, 1979), podendo limitar as informações transmitidas (Saarma *et al.*, 2009). Outra característica do DNA mitocondrial é a transmissão materna do mesmo, sendo que nos parasitas há trabalhos que revelam algumas alterações intraespecíficas (Jannotti-Passos *et al.*, 2001). Com a forte ligação existente entre os genes que compõem o genoma mitocondrial (genoma circular), a informação obtida a partir dos diferentes genes não representa filogeneticamente a história evolutiva dos genomas (Ballard e Rand, 2005). Assim é necessário o estudo de genes nucleares que apresentam características favoráveis ao estudo da evolução genómica das estirpes/espécies, tendo em atenção que podem existir no genoma nuclear cópias parálogas o que pode induzir em erros na construção da filogenia das espécies (Saarma *et al.*, 2009).

Com base em todas estas informações pretende-se verificar se existem diferenças entre o complexo *E. granulosus s.s.* (G1-G3) com base na análise filogenética de parte da sequência de 4 genes mitocondriais (COI, ATP6, 12S rRNA e 16S rRNA), e na análise dos codões codificados pelos genes COI e ATP6 e, ainda, a análise da variabilidade nucleotídica dos fragmentos 12S rRNA e 16S rRNA. Também

se pretende analisar fragmentos de dois genes nucleares ELP e EF1a de forma a avaliar as relações filogenéticas deste género, com base na análise filogenética destes genes nucleares. Vai tentar-se compreender se os fragmentos nucleares sequenciados apresentam relações diferentes entre as diversas espécies/genótipos que compõem este grupo, em relação ao que se obtém com a análise dos genes mitocondriais.

6.2. Materiais e métodos

Foram recolhidas amostras provenientes de diferentes hospedeiros intermediários, no período de Outubro de 2007 a Maio de 2011, recorrendo a diferentes matadouros e a um hospital na região centro. As amostras biológicas provenientes de animais consistiram numa colecção de 210 quistos (175 ovinos, 32 bovinos e 3 caprinos). Os isolados foram recolhidos a partir dos matadouros de Alcains, Guarda, Pedrogão Grande e Sousel, Portugal. A única amostra de um quisto hidático proveniente de um humano teve como origem um paciente do sexo masculino com 65 anos de idade, com hidatidose confirmada pela observação ao microscópio do líquido hidático e exame histopatológico, tendo sido o quisto encontrado no rim. Foram também estudadas três amostras de DNA de búfalos provenientes de Itália e duas amostras de DNA de ovinos provenientes do Brasil.

O DNA genómico foi extraído de 72 quistos férteis (tabela 2) com o kit de “High pure PCR Template Preparation” (Roche, Alemanha), conforme indicado pelo fornecedor, e armazenado a -20°C. Foram ainda utilizadas 2 amostras DNA provenientes do Brasil e 3 amostras provenientes de Itália, caracterizadas como *Echinococcus sensu stricto* G3, para comparação com as amostras portuguesas.

Fragmentos do gene mitocondrial COI (codificando a subunidade I da citocromo oxidase C) foram amplificados a partir de 77 amostras de DNA, como descrito por Bowles e McManus (1992), utilizando os *primers* JB3 / JB4.5 (Bowles e McManus, 1993). Além disso, foram amplificados ainda fragmentos de outros genes mitocondriais, utilizando *primers* concebidos para este fim (tabela 1). A amplificação por PCR foi realizada com o kit “Illustra™ puReTaq Ready-to-go PCR beads” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), utilizando 0.6µM de cada *primer* num volume final de

CAPÍTULO 6

reação de 25 µl. Os perfis térmicos de PCR incluíram 5 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, e finalmente 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio.

Tabela 1 – Sequências de *primers* desenhados para o estudo de fragmentos de genes mitocondriais

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')
ATP6F	5' AAAGTGTGGGTTTCATGTCYC 3'
ATP6R	5' CACAACATAAAHGGAAAYAAACCAAAC 3'
12SrF	5' GGTTTATTTGCCTTTTGCATCATGC 3'
12SrR	5' CCTAAGTCAACATCGAGGTGGCAAAC 3'
16SrF	5' AGCCAGGTCGGTTCTTATCTATTG 3'
16SrR	5' CGAGGGTGACGGGCGGTGTGTAC 3'

Foram também amplificados dois fragmentos de genes nucleares que codificam para a proteína esrina-radixina-moezina (ERM) – fragmento do gene ELP, e para o factor de alongação 1 alfa (EF1a) como descrito por Xiao *et al.*, 2005 e Saarma *et al.*, 2009, respectivamente. Foram utilizados os primers ELPF/ELPR e EfF/EfR, respectivamente (Xiao *et al.*, 2005, Saarma *et al.*, 2009), respeitando as condições de PCR descritas pelos mesmos autores.

Os amplicões de DNA obtidos foram directamente purificados a partir das misturas de reacção utilizando o kit “QIAquick PCR Purification” (Qiagen, Valencia, EUA), e directamente sequenciados. A PCR foi seguida por sequenciação em ambos os sentidos usando o analisador ABI 3730xl DNA. A análise das sequências de nucleótidos foi feita comparando as sequências obtidas com outras sequências depositadas nas bases de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As relações filogenéticas foram inferidas a partir de sequências de nucleótidos alinhados com MAFFT vs.6 (mantendo o alinhamento dos codões), utilizando o modelo evolutivo indicado por jModeltest (Posada, 2009), definido com base no critério

CAPÍTULO 6

informativo de Akaike (GTR+I+ Γ). As sequências de referência do parasita utilizadas foram obtidas através de consulta de bases de dados públicas. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando a aplicação informática MrBayes v3.0b4 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), e consistiram em 20×10^6 gerações a partir de uma árvore aleatória e quatro cadeias de Markov com valores padrão amostrados uma vez em cada 1000 gerações. Os primeiros 10% de árvores amostradas foram descartadas (*burn-in*). Para evitar desvios aparentes, duas séries separadas foram realizadas para cada análise. O visualizador gráfico Figtree 1.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>) foi usado para desenhar árvores filogenéticas. A todas as árvores foi-lhes associada uma raiz, correspondendo esta ao taxon *Taenia crassiceps*. Todas as sequências determinadas no decorrer deste estudo foram depositadas em bases de sequências nucleotídicas de acesso público (EMBL / GenBank / DDBJ). Foram consideradas como estatisticamente significativas apenas as probabilidades *a posteriori* superiores a 0,8 ($p > 0,8$).

A análise de aminoácidos, para os genes COI e ATP6 foi realizada com o *software* Mega 5, sendo que as sequências de aminoácidos foram inferidas a partir das sequências nucleotídicas utilizando o código genético mitocondrial dos Equinodermes e vermes achatados (“Echinoderm and flatworm mitochondrial genetic code”) (Nakao *et al.*, 2000).

A análise da diversidade nucleotídica (π) para os genes ribossômicos 12S rRNA e 16S rRNA foi realizada com a ajuda do *software* Mega 5.0 com base no modelo kimura-2-parâmetros com uma distribuição gama (G) (Tamura *et al.*, 2011, Nei e Kumar, 2000, Kimura, 1980).

6.3. Resultados

Das 77 amostras férteis usadas no presente estudo provenientes de diferentes espécies de hospedeiros intermediários como ovinos, bovinos, búfalos e humanos, observamos uma maior prevalência de amostras de ovinos em relação a todas as outras espécies (tabela 2). Em relação ao órgão parasitado, a maior prevalência foi encontrada no fígado, apesar de uma boa representatividade de amostras provenientes do pulmão.

6.3.1. Análise filogenética dos marcadores mitocondriais

As amostras foram caracterizadas com base na análise molecular de um fragmento do gene mitocondrial COI tendo-se obtido os resultados descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Característica das amostras trabalhadas por hospedeiro humano e animal, localização dos quistos e genótipo

	Número de amostras	Genótipos¹
Humano	1	G1
Hospedeiro animal		
Bovinos	12	G1 e G7
Búfalos	3	G1-G3
Ovinos	61	G1 e G1-G3
Localização dos Quistos		
Rim	1	G1
Fígado	47	G1, G1-G3 e G7
Pulmão	24	G1
Pâncreas	5	G1

¹ Genótipos definidos com base na análise do fragmento mitocondrial do gene COI (figura 1)

As árvores filogenéticas obtidas para os diferentes fragmentos de genes sequenciados foram construídas e analisadas verificando-se a existência de um complexo G1-G3 de *E. granulosus s.s.* em todas (figura 1, 2, 3, 4 e 5), com segregação de um pequeno grupo de sequências dentro deste complexo, em todas as árvores com exceção do fragmento do gene ribossomal 12S (figura 1). Este fragmento ribossomal sequenciado apresenta todas as amostras pertencentes ao complexo G1-G3 do *E. granulosus s.s.* encontram juntas, não havendo segregação de nenhuma delas dentro

deste complexo. Com os dados fornecidos por esta árvore filogenética parece que a análise do fragmento do marcador 12S rRNA estudado apresenta uma menor capacidade de resolução e existe neste fragmento um índice de variabilidade nucleotídica baixo ($\pi= 0,007$).

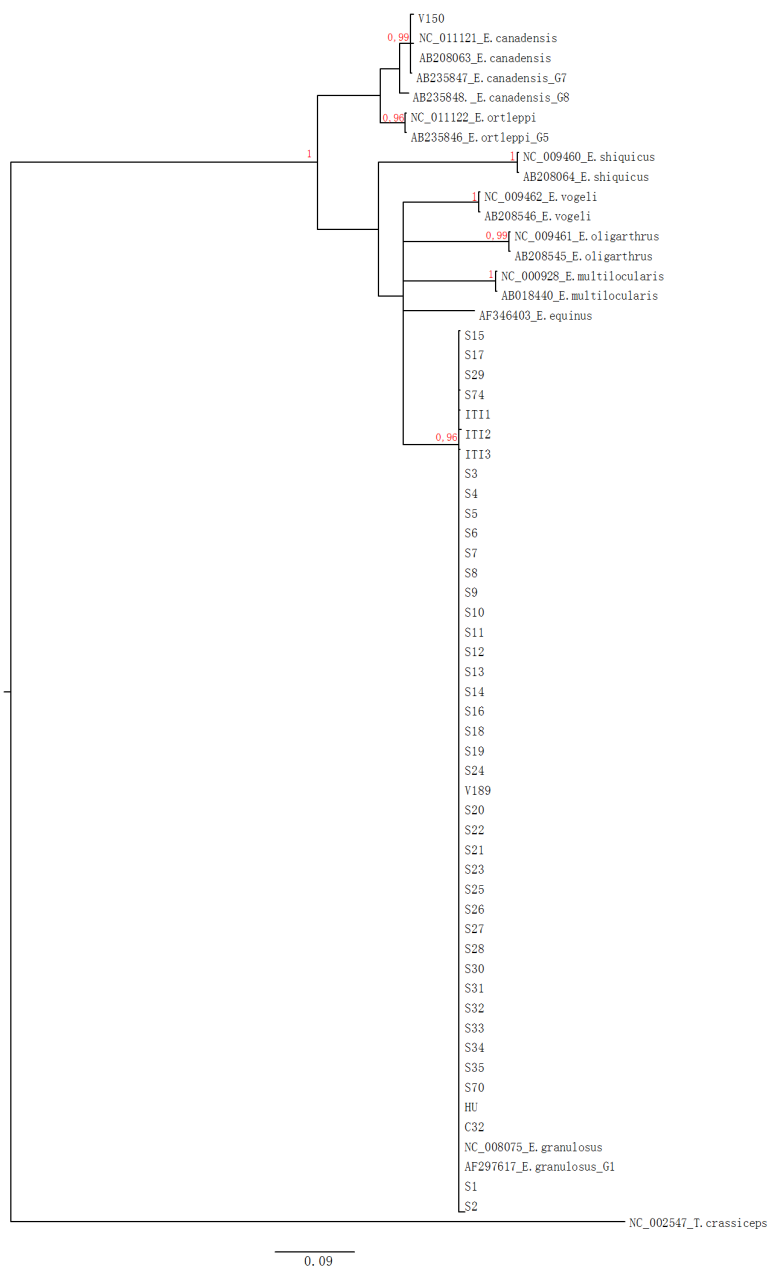


Figura 1 – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene ribossomal 12S, de *Echinococcus* sp.. As sequências obtidas das estirpes portuguesas estão indicadas por números e pelos prefixos “S”, “C” e “V” e as sequências obtidas das estirpes italianas estão indicadas pelo prefixo “IT”. A árvore foi construída tendo como *outgroup* uma sequência de *Taenia crassiceps* (NC002547). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas nas bases de dados públicas EMBL/GenBank/DDBJ com os números de acesso FR667922-FR667949 e HG975333-HG975356.

CAPÍTULO 6

Ao ser analisada apenas a árvore filogenética construída com base na análise das sequências de um fragmento (de cerca de 450 pb) do gene mitocondrial COI, consegue-se diferenciar um pequeno grupo de 5 amostras que parece segregar dentro deste complexo G1-G3 (figura 2). Neste grupo localizam-se as sequências referentes a três amostras provenientes de Itália e descritas como pertencendo ao genótipo G3 do *E. granulosus s.s.*, mas a probabilidade *a posteriori* obtida ($p=0,79$) não nos permite confirmar esta segregação, carecendo de confirmação posterior. Mesmo não obtendo um $p>0,8$ desta segregação consegue-se distinguir algumas amostras caracterizadas como genótipo G3 (amostras provenientes de Itália e algumas portuguesas) do grupo G1/G2 (figura 2). Assim, será necessário associar a esta a análise de outros marcadores mitocondriais.

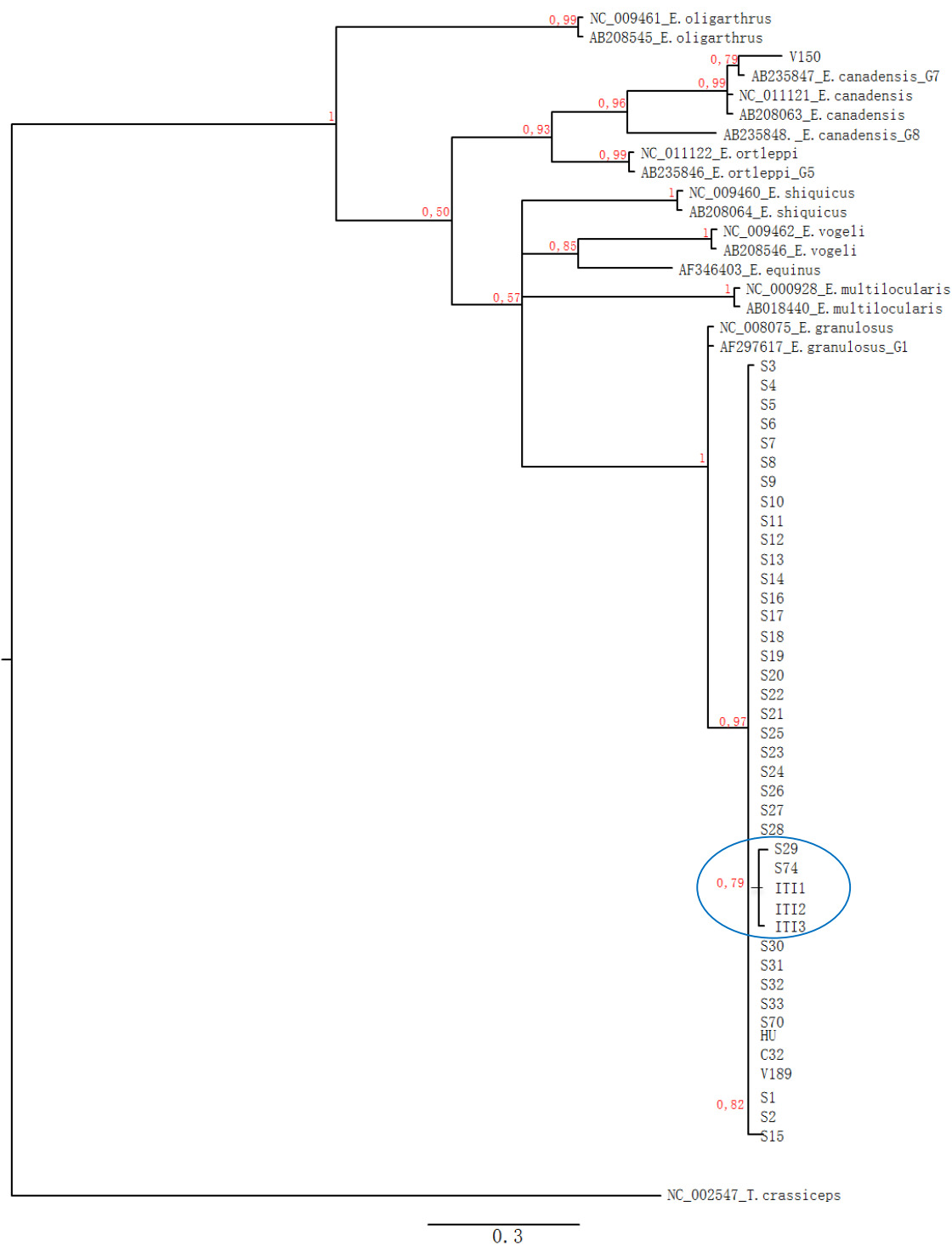


Figura 2– Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene mitocondrial COI de *Echinococcus* sp.. As sequências obtidas das estirpes portuguesas estão indicadas por números e pelos prefixos “S”, “C” e “V” e as sequencias obtidas das estirpes italianas estão indicadas pelo prefixo “IT”. A árvore foi construída tendo como *outgroup* uma sequência de *Taenia crassiceps* (NC002547). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas nas bases de dados públicas EMBL/GenBank/DDBJ com os números de acesso FN646353-FN646378, FR666904-FR666905 e HF947552-HF947598

Ao analisar as árvores filogenéticas originadas pelas sequências dos fragmentos dos genes ribossomal 16S (Figura 3) e mitocondrial ATP6 (Figura 4) individualmente, consegue-se verificar que o agrupamento de sequências, observado na figura 2, é consistentemente observado na análise destes dois fragmentos e há uma outra amostra (S15) também dentro deste grupo. Existe uma maior probabilidade *a posteriori*, tanto para a análise feita com base na sequência do fragmento ATP6 ($p=0,84$), como com base na sequência do fragmento 16S rRNA ($p=0,88$), indicando que este grupo de amostras de facto segrega dentro do complexo G1-G3 de *E. granulosus s.s.*, conseguindo distinguir assim o genótipo G3, típico do búfalo, dos genótipos G1-G2, genótipos típicos da ovelha comum e da ovelha da Tasmânia, respectivamente. Ao comparar a probabilidade *a posteriori* obtida para estes complexos na análise efectuada com as sequências destes dois fragmentos encontramos uma maior probabilidade para o fragmento 16S indicando que este poderá ser o marcador molecular mais robusto, quando usado sozinho, para a diferenciação do genótipo G3 dos outros dois (G1 e G2).

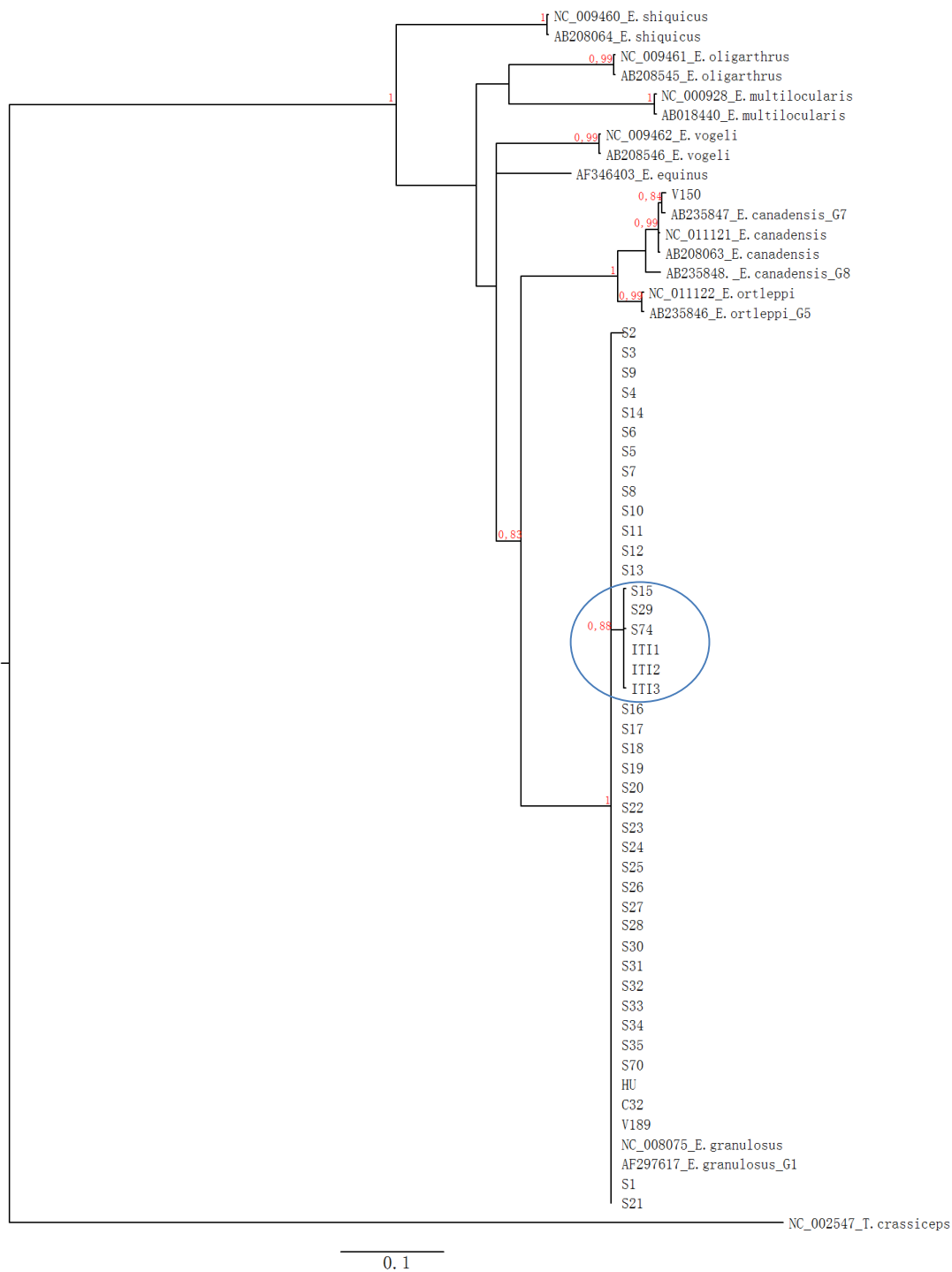


Figura 3 – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene ribossomal 16S, de *Echinococcus* sp.. As sequências obtidas das estirpes portuguesas estão indicadas por números e pelos prefixos “S”, “C” e “V” e as sequências obtidas das estirpes italianas estão indicadas pelo prefixo “IT”. A árvore foi construída tendo como *outgroup* uma sequência de *Taenia crassiceps* (NC002547). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas nas bases de dados públicas EMBL/GenBank/DDBJ com os números de acesso FR666874-FR666903 e HG975357-HG975376.

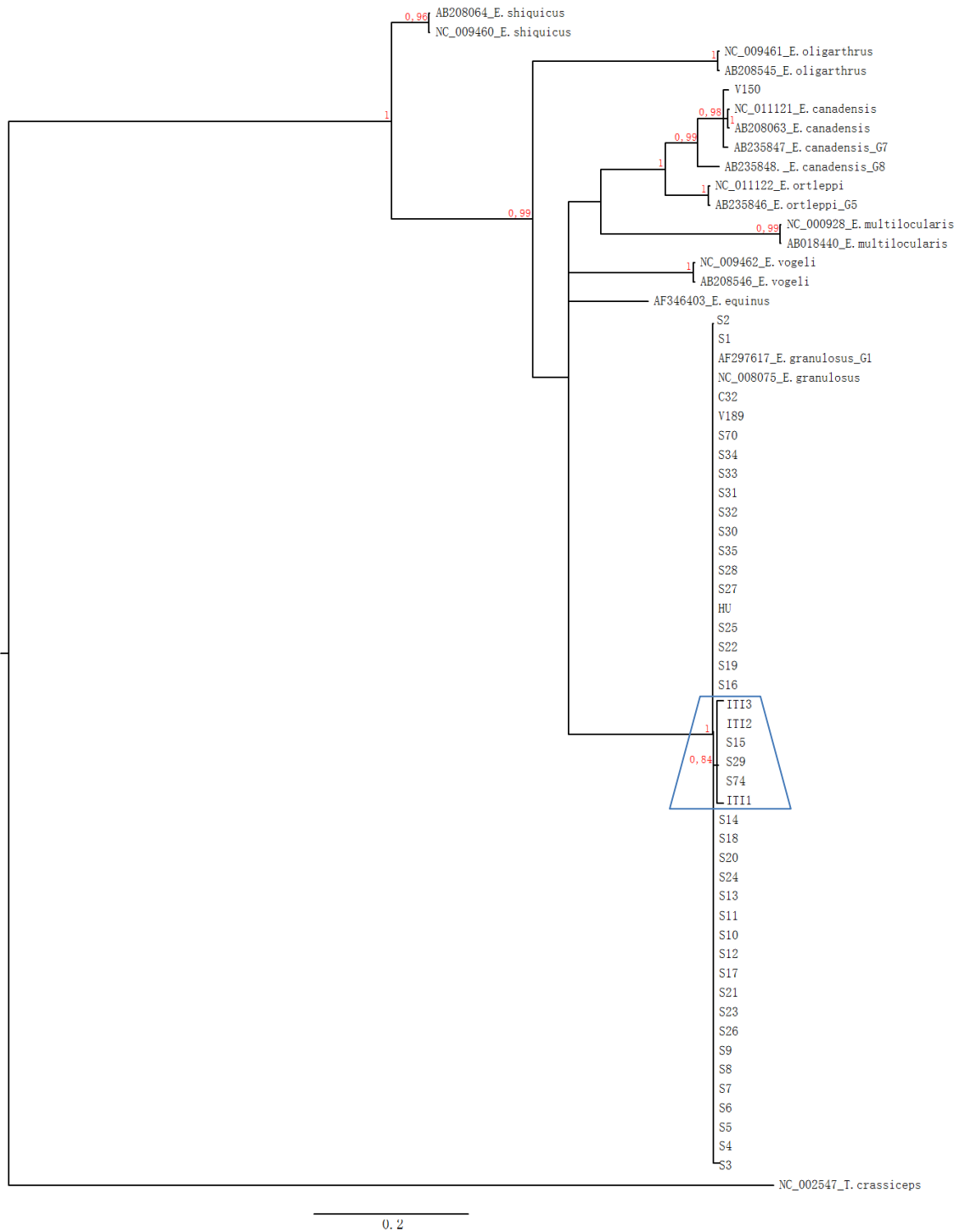


Figura 4 – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene mitocondrial ATP6, de *Echinococcus sp.*. As sequências obtidas das estirpes portuguesas estão indicadas por números e pelos prefixos “S”, “C” e “V” e as sequências obtidas das estirpes italianas estão indicadas pelo prefixo “IT”. A árvore foi construída tendo como *outgroup* uma sequência de *Taenia crassiceps* (NC002547). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas nas bases de dados públicas EMBL/GenBank/DDBJ com os números de acesso FR668537-FR668555 e HG975307-HG975332.

Ao concatenar as sequências dos quatro fragmentos amplificados (~2600pb), COI+ATP6+12S+16S (figura 5) consegue-se obter uma probabilidade *a posteriori* próximo de 0,99, revelando uma robustez bastante elevada. Com os dados obtidos existe uma elevada probabilidade de identificação do genótipo G3 de *E. granulosis s.s.* dentro do complexo G1-G3, separando-o dos genótipos G1 e G2, não sendo possível a diferenciação destes dois, separadamente.

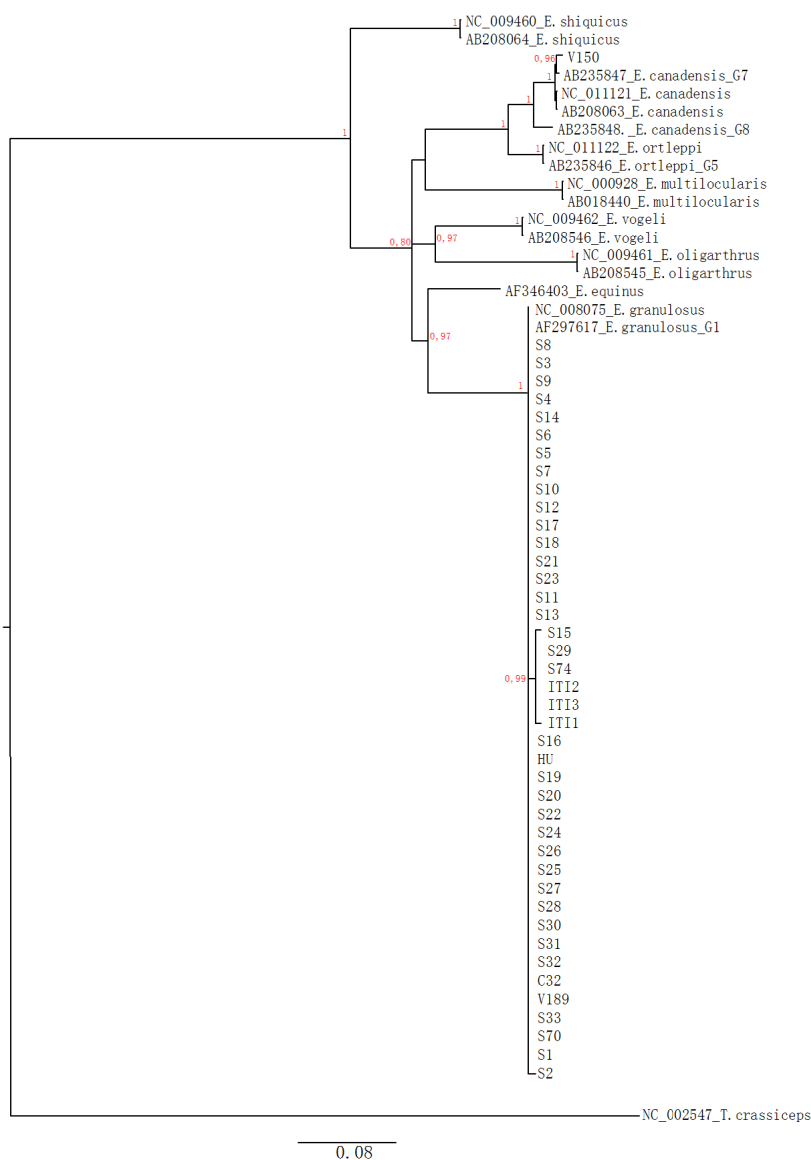


Figura 5 – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais concatenadas dos genes COI/ATP6/12S/16S (~2600 pb), de *Echinococcus sp.* As sequências obtidas das estirpes portuguesas estão indicadas por números e pelos prefixos “S”, “C” e “V” e as sequências obtidas das estirpes italianas estão indicadas pelo prefixo “IT”. A árvore foi construída tendo como *outgroup* uma sequência de *Taenia crassiceps* (NC002547). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas nas bases de dados públicas EMBL/GenBank/DDBJ.

CAPÍTULO 6

Para complementar a análise foi feita a identificação de polimorfismos que possam estar associados a estes genótipos, como sendo a análise de aminoácidos codificados pelas sequências dos fragmentos de genes mitocondriais COI e ATP6, também uma análise das sequências dos fragmentos de genes ribossômicos 12S e 16S procurando encontrar zonas de maior variabilidade e que pudessem ser únicas para determinar as diferenças entre os vários genótipos. Como base desta análise dos aminoácidos codificados pelos vários fragmentos de genes sequenciados foi tida em consideração a tabela do código genético alternativo para os equinodermes e vermes achatados (Nakao et al., 2010), devido à alteração de aminoácidos codificados por determinadas sequências.

Tabela 3 - Distribuição dos genótipos das amostras estudadas após análise dos aminoácidos codificados pela porção analisada da sequência do gene mitocondrial COI

	CODÃO*				
	16	18	20	84	87
<i>E. granulosus</i> (G1)	A	F	A	S	V
<i>E. granulosus</i> (G2)	A	F	A	S	V
<i>E. granulosus</i> (G3)	A	F	A	S	A
<i>E. equinus</i> (G4)	A	L	V	N	K
<i>E. orteppi</i> (G5)	A	L	V	N	R
<i>E. canadensis</i> (G6)	S	L	V	N	A
<i>E. canadensis</i> (G7)	S	L	V	N	A
<i>E. canadensis</i> (G8)	S	L	V	N	G
<i>E. canadensis</i> (G10)	S	L	V	N	G
<i>E. shiquicus</i>	A	F	V	N	K
<i>E. vogeli</i>	A	L	V	S	K
<i>E. oligarthus</i>	S	F	V	N	K
<i>E. multilocularis</i>	G	F	V	S	K

*A- Ala; F – Phe; G – Gly; K – Lys; L – Leu; N – Asn; R – Arg; S – Ser; V – Val.

Tabela 4 - Distribuição dos genótipos das amostras estudadas tal como definido pela análise da sequência primária dos produtos aparentemente codificados pela secção analisada do gene COI

	Codão*					Total
	16	18	20	84	87	
G1	A	F	A	S	V	68
G1BC	A	F	V	S	V	2
G1N	A	F	A	N	V	1
G3	A	F	A	S	A	5
G6/G7	S	L	V	N	A	1
					Total	77

*A – Ala; F – Phe; L – Leu; N – Asn; S – Ser; V – Val.

CAPÍTULO 6

Com base na análise dos aminoácidos codificados pela sequência do gene COI, com base na sequência AB033407 (tabela 3), foram identificados nas amostras do presente estudo, 3 genótipos diferentes e duas variantes do genótipo G1 (tabela 4). Foram identificadas mais duas amostras que na posição 20 codificavam para um resíduo de valina e não de aspartato (A20V). Foi ainda identificada uma amostra que na posição 84 codificava para um resíduo de aspartato e não um de serina (S84N), aparentemente codificado por todas as outras sequências em análise, sendo identificada como uma variante ou haplótipo do genótipo G1 (tabela 4). Esta amostra é caracterizada como sendo proveniente do pulmão de um bovino proveniente do distrito de Beja, descrita como lesão única neste hospedeiro intermediário. Na mesma data foram recolhidas amostras de outros bovinos da mesma zona geográfica, mas sendo maioritariamente amostras inférteis ou calcificadas. Foram caracterizadas mais amostras provenientes desta localização geográfica pertencentes ao genótipo G1. Com base nesta análise conseguimos diferenciar as amostras S15, S29, S74, ITI1, ITI2 e ITI3 como sendo pertencentes ao genótipo G3 de *E. granulosus s.s.*, apesar de apenas haver um aminoácido diferente entre o genótipo G1 e o G3 na posição 87.

Foi feita uma análise da sequência nucleotídica do fragmento do gene ATP6, analisando os aminoácidos codificados, tendo por base a sequência AF297617 (contém todo o gene mitocondrial ATP6 e ainda fragmentos dos genes ND4 e ND2). A partir da sequência deste gene são codificados alguns aminoácidos diferentes para as diferentes espécies, mas dentro do complexo G1-G3 de *E. granulosus s.s.* há apenas diferença em 3 aminoácidos (tabela 5). Ao analisar os aminoácidos codificados por este gene mitocondrial foi encontrada uma diferença entre os genótipos G6 e G7 de *E. canadensis* na posição 129 do mesmo, sendo que o genótipo G6 codifica para um resíduo de serina e o genótipo G7 codifica para um resíduo de metionina. No gene analisado anteriormente (COI) não era possível encontrar diferenças nos aminoácidos codificados entre estes dois genótipos. Foram também encontradas diferenças para os aminoácidos codificados, nesta mesma posição, para o genótipo G8, que codifica para um resíduo de guanina, e para o genótipo G10, que codifica para um resíduo de serina.

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos das amostras estudadas após análise dos aminoácidos codificados pela porção analisada da sequência do gene mitocondrial ATP6

	CODÃO*				
	88	115	127	129	189
<i>E. granulosus</i> (G1)	S	F	G	G	I
<i>E. granulosus</i> (G2)	S	F	?	G	?
<i>E. granulosus</i> (G3)	S	L	D	G	T
<i>E. equinus</i> (G4)	A	F	G	S	I
<i>E. ortleppi</i> (G5)	T	F	C	G	V
<i>E. canadensis</i> (G6)	T	F	C	S	V
<i>E. canadensis</i> (G7)	T	F	C	M	V
<i>E. canadensis</i> (G8)	A	F	C	G	V
<i>E. canadensis</i> (G10)	T	F	C	S	V
<i>E. shiquicus</i>	S	I	G	S	F
<i>E. vogeli</i>	S	V	S	G	I
<i>E. oligarthus</i>	T	V	G	S	V
<i>E. multilocularis</i>	T	F	C	S	V

*A – Ala; C – Cys; D – Asp; F – Phe; G – Gly; I – Ile; L – Leu; M – Met; S – Ser; T – Thr; V – Val.

A amostra V150, caracterizada como *E. canadensis*, apresentou 99% de identidade utilizando o BLASTn com as estirpes *E. canadensis* G7, mas nas árvores filogenéticas encontra-se num complexo que engloba as estirpes G6 e G7 não sendo possível fazer a segregação das mesmas. Ao analisar as sequências do fragmento do gene COI não é possível diferenciar G6 de G7 pois apesar de existirem substituições entre os nucleótidos que compõem as sequências destes genótipos estas são conservativas, resultando na conservação da sequência primária das proteínas codificadas pelos genes encontrados nos genótipos G6 e G7. No entanto ao analisar as sequências nucleotídicas do gene mitocondrial ATP6 foi possível encontrar um codão diferente na posição 129, sendo que no genótipo G6 este codifica para um resíduo de serina e no genótipo G7 codifica para um resíduo de metionina. A amostra V150 nesta posição codifica para um resíduo de metionina sendo então idêntica às sequências de referência de *E. canadensis* (G7). Este é um genótipo típico do porco e não de bovinos, sendo a primeira referência em Portugal a este genótipo neste hospedeiro intermediário.

Quanto à análise da composição das sequências nucleotídicas dos fragmentos 12S rRNA e 16S rRNA para o complexo de genótipos G1-G3 de *E. granulosus s.s.*, a diversidade nucleotídica encontrada ao comparar as amostras deste complexo foi bastante baixa, no fragmento 12S rRNA ($\pi=0,007$). No que concerne às sequências do fragmento 16S rRNA, a diversidade nucleotídica dentro do complexo de genótipos G1-

G3 foi maior ($\pi=0,056$) demonstrando que existe maior variabilidade nucleotídica no fragmento do gene 16S rRNA que no fragmento do gene 12S rRNA.

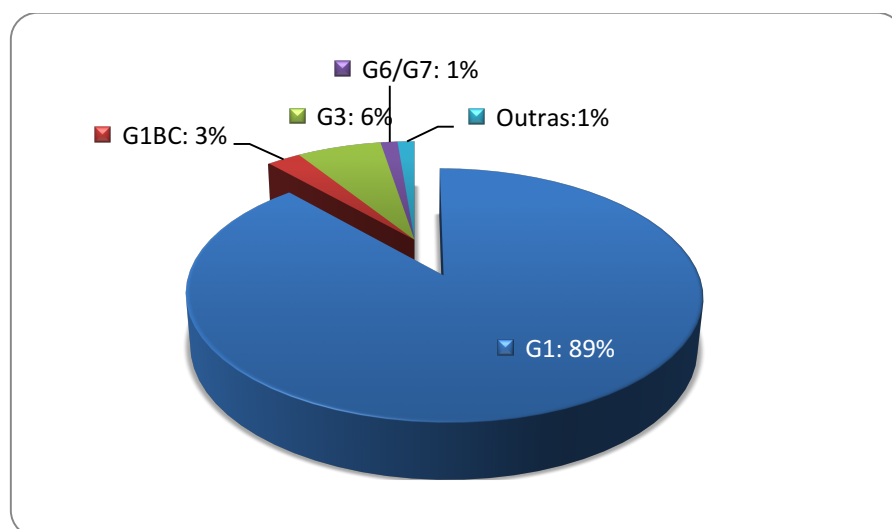


Figura 6 – Distribuição, em porcentagem, dos genótipos de *Echinococcus* obtidos pela análise dos codões do fragmento do gene mitocondrial COI no universo das amostras obtidas

Com base na análise dos aminoácidos codificados pelas sequências nucleotídicas do fragmento do gene COI foi feita uma distribuição da porcentagem de amostras por genótipo, apresentada na figura 6, indicando que as 77 amostras estudadas distribuem-se majoritariamente (~93%) pelo genótipo G1 do *E. granulosus s.s.*, tendo-se encontrado 6% de amostras pertencentes ao genótipo G3 do *E. granulosus s.s.* e 1% de amostras pertencentes aos genótipos G6/G7 do *E. canadensis*.

6.3.2. Análise filogenética dos marcadores nucleares

Para complementar o estudo realizado foram ainda amplificados dois fragmentos de genes nucleares e foi feita a sua análise filogenética separadamente.

Foram sequenciadas com sucesso apenas seis sequências nucleotídicas para o gene nuclear EF1a (factor de alongação 1 alfa) (Figura 7). Esta árvore filogenética mostra que *E. multilocularis* é o *taxon* base no gênero *Echinococcus*, havendo de seguida uma segregação do *E. shiquicus* com uma probabilidade *a posteriori* de 1. Todas as outras espécies de *Echinococcus* têm origem no mesmo ramo, com uma probabilidade *a posteriori* de 0,76. Esta probabilidade *a posteriori* obtida encontra-se próximo do limite do que é considerado aceitável ($p>0,8$), sendo necessário o estudo de

CAPÍTULO 6

outros genes nucleares. Dentro deste ramo há uma segregação com probabilidade *a posteriori* de 1, que engloba o *E. ortleppi* e o complexo *E. canadensis*. Dentro deste complexo *E. canadensis* (G6-G10) há uma separação entre os genótipos G6-G7 e os genótipos G8-G10, com probabilidades *a posteriori* de 0,91 e 1, respectivamente, revelando que com base na análise deste fragmento do gene a probabilidade destes *taxa* serem parafiléticos é elevada. As amostras usadas neste estudo segregam todas juntamente com as sequências de referência do complexo *E. granulosus s.s.*.

Quanto ao baixo número de amostras que se conseguiram sequenciar, este facto pode ter ocorrido devido ao baixo número de cópias deste gene, ou ao esgotamento do material genético utilizado para os diversos estudos feitos neste trabalho, tendo sido este o último gene a ser sequenciado. Todas as amostras que se conseguiram sequenciar encontram-se dentro do grupo de *E. granulosus s.s.*, resultados semelhantes aos obtidos com a análise dos genes mitocondriais.

Neste fragmento de 1040 pb é possível encontrarmos a sequência nucleotídica que compõe o exão 2 e parte do exão 3, num total de 1008 pb codificantes, sendo o intrão existente entre estes dois exões bastante pequeno. Ao realizar a análise filogenética apenas dos exões, o resultado foi o mesmo, obtendo as mesmas probabilidades *a posteriori*. Assim a informação não codificante neste fragmento não tem influência na análise filogenética efectuada.

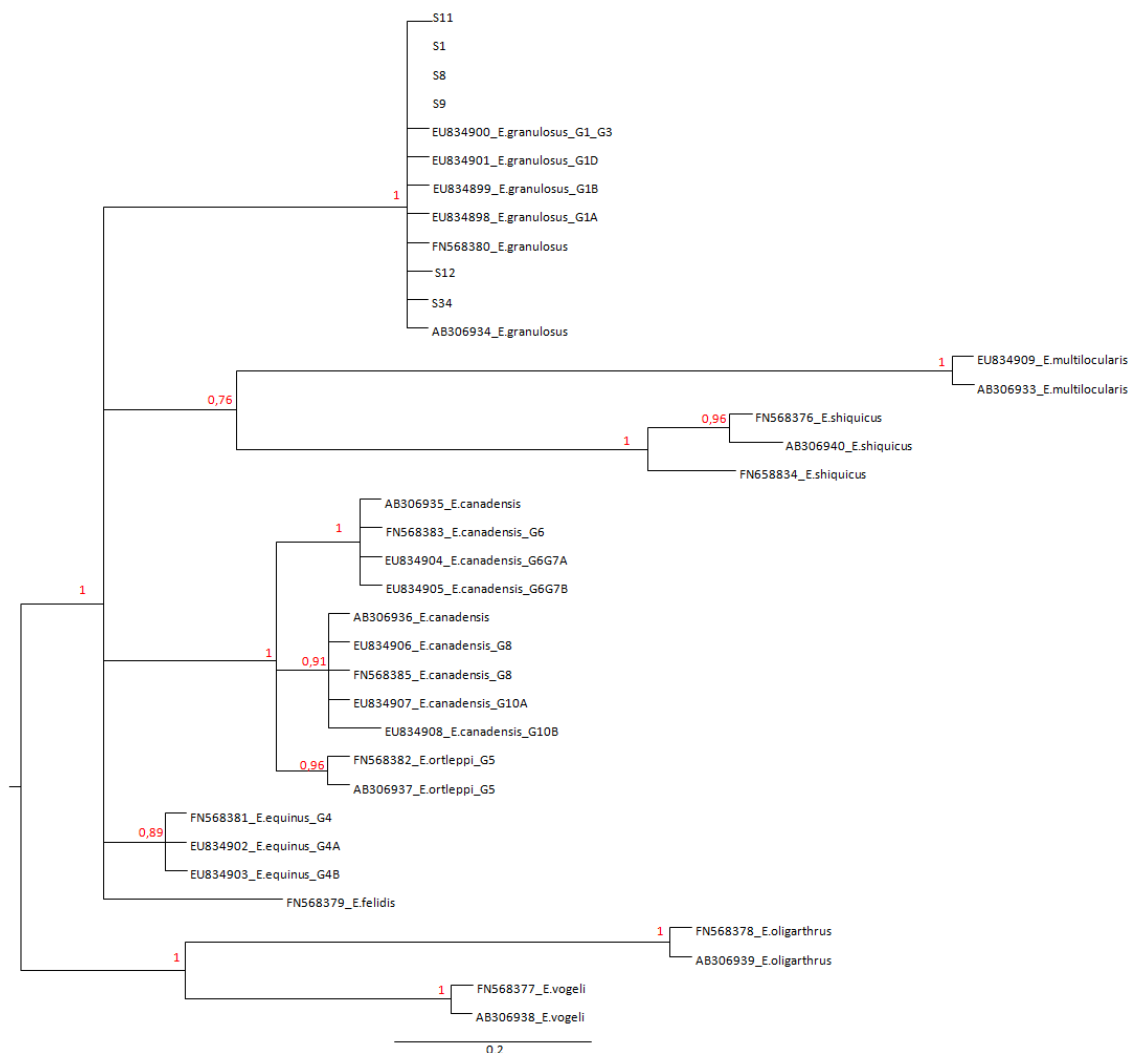


Figura 7 – Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene nuclear EF1a (1040 pb), de *Echinococcus* sp.. As sequências obtidas das estirpes portuguesas estão indicadas por números e pelos prefixos “S”. A árvore foi construída tendo como *outgroup* duas sequências de *Echinococcus multilocularis* (AB306933 e EU834909). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas nas bases de dados públicas EMBL/GenBank/DBJ.

Foi também amplificado e sequenciado um fragmento do gene nuclear ELP (Esrina-radixina-moesina like *protein*), tendo sido possível a sequenciação de 38 amostras (Figura 8). Ao analisar esta árvore filogenética encontram-se as espécies *E. oligarthrus* e *E. vogeli* como base da mesma, considerados como *taxa* irmãos de todas as outras espécies de *Echinococcus*. Seguidamente a árvore segrega em três grupos diferentes sendo um composto por *E. equinus*, outro por *E. shiquicus* e *E. multilocularis* e outro por todas as restantes espécies de *Echinococcus*. Todos os grupos segregados apresentam elevada probabilidade *a posteriori* encontrando-se esta entre 0,88 e 1. Em relação às amostras do presente estudo encontramos uma (V150) que segrega

CAPÍTULO 6

juntamente com os genótipos *E. canadensis* G6 e G7, os quais são segregados em conjunto. Estes genótipos estão separados do *E. canadensis* G8-G10 por uma elevada probabilidade *a posteriori* ($p=1$). A probabilidade *a posteriori* de *E. felidis* estar separado do complexo *E. granulosus s.s.* é de 0,86, revelando elevada probabilidade para que de facto seja o que acontece. Quanto às restantes amostras, encontram-se todas contidas no complexo *E. granulosus* G1-G3, dentro do qual encontramos dois pequenos grupos, contendo cada um duas amostras, que segregam sendo que duas destas amostras são as amostras Italianas (ITI1 e ITI3), descritas anteriormente como pertencentes ao genótipo G3. O outro pequeno grupo que segrega com elevada probabilidade são as amostras V189 e S71, amostras descritas morfológicamente como pertencentes a fígado de ovino e fígado de bovino respectivamente, provenientes da região do Alentejo.

A análise filogenética feita com toda a sequência nucleotídica (905 pb) ou apenas com o fragmento do exão (55 pb), não demonstra uma topologia da árvore diferente, apenas se alterando os valores da probabilidade *a posteriori*. Estes demonstraram uma baixa resolução, pois a sequência codificante é muito pequena quando comparada com o tamanho total da sequência analisada.

Neste gene também não foi possível a amplificação e sequenciação de todas as amostras em estudo, provavelmente pelo baixo número de cópias do gene, à degeneração do material genético, manipulações diversas e esgotamento do mesmo material.

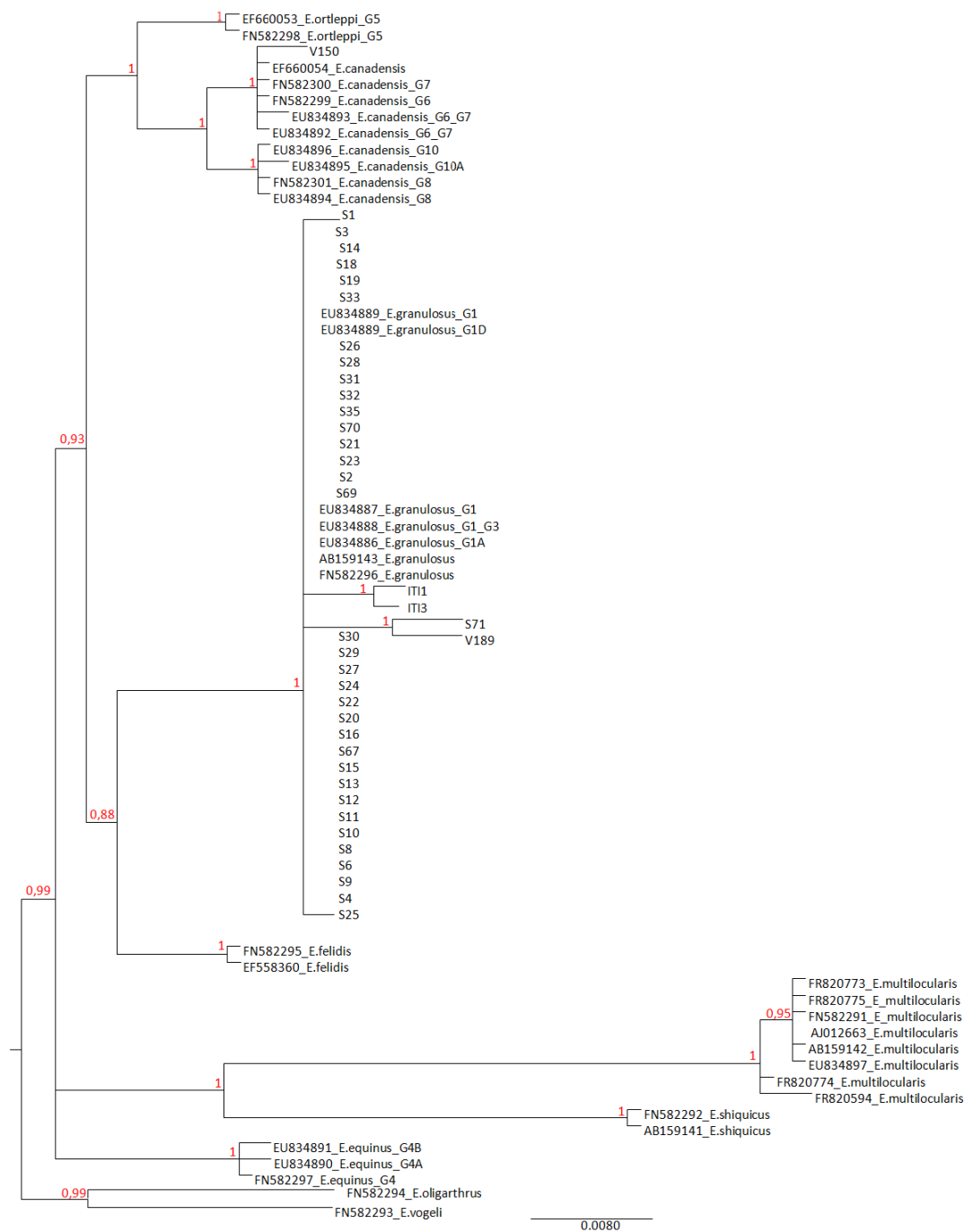


Figura 8 - Árvore filogenética (análise bayesiana) gerada a partir da análise das sequências parciais do gene nuclear ELP (914 pb), de *Echinococcus* sp.. As sequências obtidas das estirpes portuguesas estão indicadas por números e pelos prefixos “S” e “V” e as sequencias obtidas das estirpes italianas estão indicadas pelo prefixo “IT”. A árvore foi construída tendo como *taxa* de base uma sequência de *E. oligarthrus* (FN582294) e outra de *E. vogeli* (FN582293). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas nas bases de dados públicas EMBL/GenBank/DDBJ.

6.4. DISCUSSÃO

Quando se comparam as sequências de referência de *E. granulosus* registadas nas bases de dados é possível identificar e distinguir grande parte das espécies pertencentes ou que pertenceram ao complexo *E. granulosus*. No entanto, dentro do complexo G1-G3 do *E. granulosus s.s.*, é difícil identificar as diferenças entre os genótipos G1, G2 e G3. Com base nessas informações tentou-se verificar se existiam diferenças dentro do complexo *E. granulosus s.s.* (G1-G3) sequenciando fragmentos dos genes mitocondriais COI e ATP6 e dos genes ribossómicos 12S rRNA e 16S rRNA. A análise dos resultados foi feita com base na análise filogenética dos quatro fragmentos dos genes sequenciados, na análise dos codões codificados pelos fragmentos dos genes mitocondriais e ainda pela análise da diversidade nucleotídica dos fragmentos dos genes ribossómicos 12S rRNA e 16S rRNA.

A presença de amostras pertencentes ao complexo G1-G3 do *E. granulosus s.s.* não apresenta uma novidade, pois este complexo é o que se encontra com maior dispersão mundial e amplamente adaptado a diversos hospedeiros intermediários (Sharma *et al.*, 2013, Romig, 2003). Em Portugal, a maior parte das amostras sequenciadas encontram-se caracterizadas como pertencentes ao complexo G1-G3 do *E. granulosus s.s.* sendo este o que representa maior infecciosidade para o Homem (Beato *et al.*, 2010). A diferenciação entre os três genótipos que compõem este complexo não é fácil, pois a maior parte dos genes mitocondriais apresentam alguma variabilidade nucleotídica nas suas sequências, mas que se reflete numa baixa variabilidade de aminoácidos codificados (Boufana *et al.*, 2014). Como foi possível verificar, ao analisar cerca de 2600 pb houve uma diferenciação entre o *E. granulosus* G3 e o complexo *E. granulosus* G1/G2, com uma elevada probabilidade *a posteriori* ($p=0,99$). Este facto foi apoiado pela diferença existente entre os aminoácidos codificados pelos genes ATP6 e COI, demonstrando que entre estes genótipos há 2 e 1 aminoácidos diferentes, respectivamente. A análise dos fragmentos dos genes ribossómicos 12S e 16S demonstra um menor grau de variabilidade nucleotídica, não se identificando zonas específicas para esta variabilidade, sendo que no fragmento do gene 12S há uma variabilidade nucleotídica muito baixa entre as amostras analisadas. Como foi comprovado na árvore filogenética obtida para este fragmento, não há segregação de

CAPÍTULO 6

amostras no complexo denominado G1-G3 de *E. granulosus s.s.*, facto comprovado pela literatura que indica um elevado grau de conservação nucleotídica por parte deste gene ribossómico (Calderini *et al.*, 2012). Quanto ao fragmento ribossómico 16S, apesar de não apresentar zonas de variabilidade nucleotídica passíveis de identificação, ao efectuar a análise filogenética deste fragmento consegue-se identificar a segregação de cinco amostras dentro do complexo *E. granulosus s.s.*, sendo assim possível identificar o genótipo G3.

Ao realizar a análise dos aminoácidos codificados pelo fragmento do gene COI foram identificadas duas variantes do genótipo G1, tendo sido uma destas (G1BC) já descrita em Itália (Boue *et al.*, 2010) e uma que ainda não tinha sido descrita (G1N). A variante descrita neste estudo foi obtida de um animal proveniente da zona do Alentejo, considerada hiperendémica pela OMS (Gemmell *et al.*, 2001). Sabe-se que o genótipo G1 é o mais amplamente distribuído e aquele que se encontra numa maior diversidade de hospedeiros intermediários, podendo por isso apresentar maior número de haplótipos como já foi descrito em diversos estudos (Boufana *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2014, Sharma *et al.*, 2013, Vural *et al.*, 2008)

Ao longo dos últimos anos foram realizados estudos que indicavam que a variabilidade nucleotídica existente entre os três genótipos pertencentes ao complexo *E. granulosus s.s.* era muito baixa e foi colocada a hipótese de que o genótipo G3 poderia ser uma variante do genótipo G1 ou que poderiam ser dois genótipos intimamente relacionados. Foi comprovado pela análise de diversos genes mitocondriais que não é possível diferenciar os genótipos G1 de G2 (Maurelli *et al.*, 2009, Busi *et al.*, 2007, Roratto *et al.*, 2006, Obwaller *et al.*, 2004). No presente estudo, com base na diferenciação dos aminoácidos codificados, também foi possível encontrar diferenças entre o genótipo G3 e o grupo de genótipos G1/G2, levando a pensar que se trata de dois genótipos diferentes. Continua a permanecer a dúvida da classificação do genótipo G2, se deve ser classificado como um genótipo independente ou apenas como uma variante dos genótipos G1 e/ou G3 de *E. granulosus s.s.*

Ao analisar os marcadores moleculares estudados de forma independente consegue-se identificar o 16S rRNA como sendo o que apresenta uma probabilidade *a posteriori* individual mais elevada para a diferenciação do género *Echinococcus*. Desta

CAPÍTULO 6

forma, este marcador de entre os estudados, poderá ser o marcador a utilizar individualmente para a diferenciação entre estes genótipos G1/G2 e G3. De entre os fragmentos de marcadores moleculares analisados este é aquele para o qual a segregação de um possível agrupamento de sequências do genótipo G3 foi melhor suportada do ponto de vista estatístico. Os trabalhos realizados por Wang *et al.* (2015) apresentaram dados que estão de acordo com os resultados apresentados neste trabalho, defendendo que o fragmento 16S rRNA poderá ser um bom candidato à caracterização e separação dos genótipos dentro do complexo *E. granulosus s.s* G1-G3 (Wang *et al.*, 2015).

De entre as amostras analisadas foi encontrada uma amostra que apresentou 100% de homologia com sequências de referência do genótipo G7. Ao analisar as árvores filogenéticas deste complexo de *E. canadensis* G6-G10 surgem algumas dúvidas quanto à possível segregação entre os genótipos G6 e G7 pois na maior parte dos marcadores utilizados noutros estudos ficam dúvidas acerca das diferenças entre estes dois genótipos (Lymbery *et al.*, 2015, Nakao *et al.*, 2013).

A topologia das árvores filogenéticas sugere que os genótipos G6 e G7 do *E. canadensis* são descendentes de um ancestral comum, que terá utilizado os cervídeos como hospedeiros intermediários. As relações filogenéticas próximas entre os genótipos G10 e G6/G7, sugeridas por uma análise comparativa das topologias das diferentes árvores filogenéticas obtidas, deixam dúvidas quanto à forma de tratar os genótipos G8 e G10 de *E. canadensis*, se como espécies independentes dos genótipos G6 e G7 de *E. canadensis*, ou se estes pertencem todos ao mesmo complexo com algumas diferenças nucleotídicas entre eles (Wang *et al.*, 2015, Boufana *et al.*, 2014, Nakao *et al.*, 2013). Além dos estudos moleculares, a diferenciação dos genótipos de *E. canadensis* também depende de estudos feitos nos hospedeiros intermediários e na sua susceptibilidade à infecção (Sharma *et al.*, 2013).

No presente estudo, ao analisar as sequências nucleotídicas do gene mitocondrial ATP6 que codificam a subunidade 6 da proteína ATP sintase F₀, encontrou-se apenas um aminoácido diferente entre as sequências de referência destes dois genótipos, tendo a amostra portuguesa (V150), encontrada num bovino, o mesmo aminoácido codificado

no genótipo G7. Apesar de se ter obtido esta informação, a diferença genética é muito pouco significativa, sendo necessários mais estudos para avaliar as diferenças entre os diferentes genes neste complexo.

Quanto à análise dos marcadores nucleares, foram sequenciados dois fragmentos de genes nucleares EF1a e ELP, englobando regiões codificantes dos mesmos (exões) e regiões não codificantes (intrões), as quais podem ter influência na filogenia dos diversos genótipos de *E. granulosus* e das espécies que compõem o género *Echinococcus*.

O gene nuclear ELP (esrin-radixin-moesin like protein) pertence à família de proteínas ERM, formada por ezrina, radixina e moesina, proteínas que auxiliam a interação entre o citoesqueleto e a membrana plasmática, e ainda participam na via de transdução de sinal de algumas vias de sinalização (Bretscher *et al.*, 2000). Este gene foi inicialmente descrito em *E. multilocularis*, mas posteriormente comprovou-se a sua existência em todas as outras espécies e genótipos de *Echinococcus*, sendo utilizado para análise filogenética do género *Echinococcus* (Saarma *et al.*, 2009). Neste género, a proteína codificada por este gene desempenha um importante papel nas ligações entre células e na adesão das células ao substracto, sugerindo importância desta no crescimento do parasita (Brehm *et al.*, 1999).

No presente estudo foi demonstrada uma topologia da árvore filogenética baseada no fragmento do gene ELP muito semelhante à descrita por Knapp *et al.* 2011, onde são descritas as espécies *E. oligarthrus* e *E. vogeli* como a base da árvore havendo depois uma segregação de *E. equinus* em dois grupos, sendo um constituído por *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, complexo *E. granulosus s.s.* e *E. felidis* e o outro pelo complexo *E. canadensis* e *E. ortleppi* (Knapp *et al.*, 2011). Dentro do grupo que inclui *E. felidis* e o complexo *E. granulosus s.s.* a probabilidade *a posteriori* de segregação destes é menor (0,88) que a dos outros grupos e espécies representados na árvore filogenética, informação também descrita por Knapp *et al.* 2011. Num estudo realizado em 2009 por Saarma *et al.* a topologia das árvores filogenéticas baseadas em genes nucleares foi ligeiramente diferente pois eles utilizaram sequências de 5 genes nucleares concatenados, logo uma maior probabilidade de ser essa a melhor distribuição filogenética do género *Echinococcus*. No presente estudo só foi possível construir esta

CAPÍTULO 6

árvore filogenética com base numa sequência de 914 pb, daí que a topologia da árvore possa ser ligeiramente diferente, nomeadamente na posição do *E. equinus* e do complexo *E. granulosus s.s.* em relação às outras espécies de *Echinococcus*. Dentro do complexo *E. granulosus s.s.* duas amostras foram caracterizadas, usando marcadores mitocondriais, como pertencentes ao genótipo G3, e onde foram segregadas da maior parte das outras amostras do estudo com um elevado valor de probabilidade ($p=1$), demonstrando que com a análise do fragmento deste gene também se consegue fazer a distinção do genótipo G3 em relação aos genótipos G1/G2. Existem outras duas amostras dentro deste complexo que segregam com elevada probabilidade ($p=1$), podendo ser haplótipos dos genótipos G1/G2. Como já foi descrito em alguns estudos, nos genes nucleares, pode haver cruzamento de informação genética, havendo regiões codificantes e outras não codificantes, podendo residir numa destas informações a razão para a diferença entre estas amostras e as restantes que completam este complexo (Nakao *et al.*, 2013, Knapp *et al.*, 2011, Saarma *et al.*, 2009).

Quanto ao gene EF1a (factor de alongação 1 alfa) este vai codificar uma proteína que promove a ligação do tRNA aos ribossomas durante a síntese proteica. Este gene descrito em alguns estudos realizados com amostras do género *Echinococcus*, mais concretamente com amostras dos complexos *E. granulosus s.s.* e *E. canadensis*, e amostras de *E. vogeli* e *E. ortleppi*, apresenta-se mostrando uma árvore semelhante no que concerne à posição de *E. vogeli*, como base da árvore filogenética, na segregação do complexo *E. canadensis* com *E. vogeli* e na segregação do complexo *E. granulosus s.s.* (Nakao *et al.*, 2010, Moro *et al.*, 2009). Quanto à posição onde se encontram as outras espécies de *Echinococcus*, há pequenas variações que podem ser devidas ao menor comprimento da sequência nucleotídica analisada quando comparada com os estudos que usaram sequências nucleotídicas maiores para a construção da árvore filogenética (Boufana *et al.*, 2014, Knapp *et al.*, 2011, Saarma *et al.*, 2009).

Como referido anteriormente, a árvore filogenética obtida apenas com a análise dos exões foi igual à obtida com os 1040 pb deste gene, indicando que provavelmente será devido à baixa taxa de mutações no intrão existente entre estes dois exões, informação já encontrada noutros estudos com este gene (Knapp *et al.*, 2011, Moro *et al.*, 2009). Como já foi mencionado, o número de amostras amplificadas e sequenciadas foi pequeno, igual situação que ocorreu num estudo realizado por Moro *et al.* (2009),

CAPÍTULO 6

onde foi sugerido que este facto se podia dever provavelmente ao baixo número de cópias deste gene nuclear (Moro *et al.*, 2009). Tal como no presente estudo, este fragmento já tinha demonstrado pouca variabilidade ao nível intra-específico (Nakao *et al.*, 2010, Moro *et al.*, 2009).

Não foi possível comparar os resultados obtidos a partir da análise das sequências nucleotídicas mitocondriais e nucleares, pois o número de amostras que se conseguiram sequenciar é bastante inferior nos fragmentos de genes nucleares do que nos fragmentos de genes mitocondriais. Enquanto que na análise obtida a partir dos genes mitocondriais concatenados se consegue fazer a distinção dentro do complexo *E. granulosus s.s.* do genótipo G3 em relação aos genótipos G1/G2, na análise feita aos fragmentos nucleares consegue-se ver a separação das sequências italianas (caracterizadas como genótipo G3) das outras sequências do complexo, mas serão necessários mais estudos para se poder confirmar esta informação. Quanto à amostra (V150) que segrega juntamente com *E. canadensis* G6/G7 tanto na análise dos fragmentos mitocondriais concatenados como nos nucleares, não é possível saber, com base estatística, a qual destes genótipos a amostra pertence. Não é possível neste estudo obter a separação destes genótipos, sendo necessária a análise de outros marcadores, tanto mitocondriais como nucleares, para confirmar esta informação.

6.5. Referências bibliográficas

- ANDRESIUK, M. V., GORDO, F. P., SAARMA, M., ELISSONDO, M. C., TARABORELLI, A., CASALONGUE, C., & SAARMA, U. 2013. *Echinococcus granulosus* genotype G1 dominated in cattle and sheep during 2003-2006 in Buenos Aires province, an endemic area for cystic echinococcosis in Argentina. *Acta Trop*, 127, 136-142.
- BEATO, S., PARREIRA, R., CALADO, M., & GRÁCIO, M.A.A. 2010. Apparent dominance of the G1–G3 genetic cluster of *Echinococcus granulosus* strains in the central inland region of Portugal, *Parasitol Int*, 59, 638-642
- BALLARD, J. W. O. & RAND, D. M. 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 36, 621–642.
- BOUBAKER, G., MACCHIAROLI, N., PRADA, L., CUCHER, M. A., ROSENZVIT, M. C., ZIADINOV, I., & SPILLOTIS, M. 2013 A multiplex PCR for the simultaneous detection and genotyping of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2017.
- BOUE, F., BOES, J., BOIREAU, P., CLAES, M., COOK, A. J. C., DORNY, P. & ZIMMER, I. A. 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of *Echinococcus* in animals and foodstuffs in the European Union. *EFSA*, 1-41
- BOUFANA, B., LAHMAR, S., REBAI, W., BEN SAFTA, Z., JEBABLI, L., AMMAR, A., & CRAIG, P. S. 2014. Genetic variability and haplotypes of *Echinococcus* isolates from Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 108, 706-714.
- BOWLES, J., BLAIR, D., & MCMANUS, D. P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*, 54, 165-173.
- BOWLES J., MCMANUS D. P. 1993. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*, *Int J Parasitology*, 23 , 969-972.

CAPÍTULO 6

- BRETSCHER, A. 2000. The cytoskeleton: from regulation to function. Conference: the 15th Meeting of the European Cytoskeleton Forum. *EMBO Rep*, 1, 473-476.
- BROWN, W. M., GEORGE, M., J. R., & WILSON, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 1967-1971.
- BROWN, A. P. 1983. Codon-level analysis of histone primary sequence: evidence of a repeat tetrapeptide origin and later inclusion of transcribed sequence. *J Theor Biol*, 104, 401-416.
- BUSI, M., SNABEL, V., VARCASIA, A., GARIPPA, G., PERRONE, V., DE LIBERATO, C., & D'AMELIO, S. 2007. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol*, 150, 75-83.
- CALDERINI, P., GABRIELLI, S., & CANCRINI, G. 2012. Is the goat a new host for the G3 Indian buffalo strain of *Echinococcus granulosus*? *ScientificWorldJournal*, 2012, 286357.
- CASULLI, A., MANFREDI, M. T., LA ROSA, G., CERBO, A. R., GENCHI, C., & POZIO, E. 2008. *Echinococcus ortleppi* and *E. granulosus* G1, G2 and G3 genotypes in Italian bovines. *Vet Parasitol*, 155, 168-172.
- CRAIG, P. S., MCMANUS, D. P., LIGHTOWLERS, M. W., CHABALGOITY, J. A., GARCIA, H. H., GAVIDIA, C. M., & SCHANTZ, P. M. 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis*, 7, 385-394.
- DAVID DE MORAIS, J.A. 2010. The rise and decline of human hydatid disease in Portugal: historical and epidemiological analysis. *Med Int*, 17, 246-256.
- GEMMELL, M. A., ROBERTS, M. G., BEARD, T. C., & LAWSON, J.R. 2001. Epidemiology: Quantitative epidemiology and transmission dynamics with special reference to *Echinococcus granulosus*. eds. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. *Office Internationales Epizooties*, 143-156.
- HÜTTNER, M., NAKAO, M., WASSERMANN, T., SIEFERT, L., BOOMKER, J. D., DINKEL, A. & ITO, A. 2008. Genetic characterization and phylogenetic position

CAPÍTULO 6

- of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol*, 38, 861-868.
- ITO, A., DORJSUREN, T., DAVAASUREN, A., YANAGIDA, T., SAKO, Y., NAKAYA, K. & CHULUUNBAATAR, G. 2014. Cystic echinococcoses in Mongolia: molecular identification, serology and risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2937.
- JANNOTTI-PASSOS, L. K., SOUZA, C. P., PARRA, J. C. & SIMPSON, A. J. 2001. Biparental mitochondrial DNA inheritance in the parasitic trematode *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*, 87, 79-82.
- KIMURA M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16, 111-120.
- KNAPP, J., NAKAO, M., YANAGIDA, T., OKAMOTO, M., SAARMA, U., LAVIKAINEN, A. & ITO, A. 2011. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Mol Phylogenet Evol*, 61, 628-638.
- LYMBERG A.J., JENKINS E.J., SCHURER J.M. & THOMPSON R.C. 2015. *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends in Parasitology*, 31, 121-126.
- MAURELLI, M. P., RINALDI, L., CAPUANO, F., PERUGINI, A. G. & CRINGOLI, G. 2009. Development of a real-time PCR for the differentiation of the G1 and G2/G3 genotypes of *Echinococcus granulosus*, *Parasitology Research*, 105, 255–259.
- MCMANUS, D. P. 2013. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology*, 140, 1617-1623.
- MOKS, E., JOGISALU, I., VALDMANN, H. & SAARMA, U. 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology*, 135, 647-654.
- MORO, P., & SCHANTZ, P. M. 2009. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis*, 13, 125-133.

CAPÍTULO 6

- NAKAO, M., SAKO, Y., YOKOYAMA, N., FUKUNAGA, M., & ITO, A. 2000. Mitochondrial genetic code in cestodes. *Mol Biochem Parasitol*, 111, 415-424.
- NAKAO, M., MCMANUS, D. P., SCHANTZ, P. M., CRAIG, P. S., & ITO, A. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, 134, 713-722.
- NAKAO, M., LI, T., HAN, X., MA, X., XIAO, N., QIU, J., & ITO, A. 2010. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Int J Parasitol*, 40, 379-385.
- NAKAO, M., YANAGIDA, T., KONYAEV, S., LAVIKAINEN, A., ODNOKURTSEV, V. A., ZAIKOV, V. A., & ITO, A. 2013. Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology*, 140, 1625-1636.
- NEI M. AND KUMAR S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford University Press*, New York.
- OBWALLER, A., SCHNEIDER, R., WALOCHNIK, J., GOLLACKNER, B., DEUTZ, A., JANITSCHKE, K., & AUER, H. 2004. *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology*, 128, 569-575.
- PEDNEKAR, R. P., GATNE, M. L., THOMPSON, R. C., & TRAUB, R. J. 2009. Molecular and morphological characterisation of *Echinococcus* from food producing animals in India. *Vet Parasitol*, 165, 58-65.
- POSADA D. 2009. Selection of models of DNA evolution with jModelTest. *Methods Mol Biol*, 537, 93-112.
- RINALDI, L., MAURELLI, M. P., CAPUANO, F., PERUGINI, A. G., VENEZIANO, V., & CRINGOLI, S. 2008. Molecular update on cystic echinococcosis in cattle and water buffaloes of southern Italy. *Zoonoses Public Health*, 55, 119-123.
- ROMIG, T. 2003. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg*, 388, 209-217.

CAPÍTULO 6

- RONQUIST, F., & HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- RORATTO, P. A., BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L., GUTIERREZ, A. M., KAMENETZKY, L., ROSENZVIT, M. C., & ZAHA, A. 2006. Detection of genetic polymorphism among and within *Echinococcus granulosus* strains by heteroduplex analysis of a microsatellite from the U1 snRNA genes. *Genet Mol Res*, 5, 542-552.
- SAARMA, U., JOGISALU, I., MOKS, E., VARCASIA, A., LAVIKAINEN, A., OKSANEN, A., & MARAVILLA, P. 2009. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology*, 136, 317-328.
- SANTOS, G. B., SOARES MDO, C., DE, F. B. E. M., RODRIGUES, A. L., SIQUEIRA, N. G., GOMES-GOUVEA, M. S., & HAAG, K. L. 2012. Mitochondrial and nuclear sequence polymorphisms reveal geographic structuring in Amazonian populations of *Echinococcus vogeli* (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol*, 42, 1115-1118.
- SHARMA, M., SEHGAL, R., FOMDA, B. A., MALHOTRA, A., & MALLA, N. 2013. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* cysts in north Indian patients: identification of G1, G3, G5 and G6 genotypes. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2262.
- TAHA, H. A. 2012. Genetic variations among *Echinococcus granulosus* isolates in Egypt using RAPD-PCR. *Parasitol Res*, 111, 1993-2000.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739
- THOMPSON, R. C., & MCMANUS, D. P. 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*, 18, 452-457.
- THOMPSON, R. C. 2008. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*, 119, 439-446.

- VURAL, G., BACA, A. U., GAUCI, C. G., BAGCI, O., GICIK, Y., & LIGHTOWLERS, M. W. 2008. Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol*, 154, 347-350.
- WANG, J., WANG, N., HU, D., ZHONG, X., WANG, S., GU, X., & YANG, G. 2014. Genetic diversity of *Echinococcus granulosus* in southwest China determined by the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 gene. *ScientificWorldJournal*, 2014, 867839.
- WANG, N., WANG, J., HU, D., ZHONG, X., JIANG, Z., YANG, A., & YANG, G. 2015. Genetic variability of *Echinococcus granulosus* based on the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *Mitochondrial DNA*, 26, 396-401
- XIAO, N., QIU, J., NAKAO, M., LI, T., YANG, W., CHEN, X., & ITO, A. 2005. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol*, 35, 693-701.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A hidatidose/equinococose, causada pela ingestão acidental de ovos de *E. granulosus* apresenta diferenças significativas no ciclo de vida entre o hospedeiro definitivo canino e os diversos hospedeiros intermediários. A hidatidose humana, mundialmente descrita com menor frequência, continua a apresentar novos casos todos os anos, tendo havido nos últimos anos um aumento desta incidência nos países de Leste Europeu (Piccoli *et al.*, 2013).

Portugal continua a ser considerado pela OMS como um país hiperendémico (Gemmell *et al.*, 2001) havendo uma maior preponderância na zona do Alentejo (David Morais, 2010). Na zona centro, concretamente na zona de Cantanhede foi feito um estudo em hospedeiros definitivos (cães) onde em 301 amostras fecais recolhidas nenhuma foi positiva para ovos deste parasita, mostrando que as campanhas de controlo parecem estar a funcionar de forma correcta (Cardoso *et al.*, 2014). Quanto à situação epidemiológica na Europa há poucos estudos epidemiológicos que consigam abranger uma grande região geográfica e os que existem revelam um aumento da incidência desta parasitose no Leste da Europa em países como Roménia, Moldávia, Eslováquia e Polónia (Chihai *et al.*, 2015, Alvarez Rojas *et al.*, 2014, Umhang *et al.*, 2014, Piccoli *et al.*, 2013), sendo alguns destes países considerados hiperendémicos, com mais de 50% de amostras de bovinos e ovinos positivas para quisto hidático (Umhang *et al.*, 2014).

Os quistos férteis obtidos de amostras de ovinos são mais comumente encontrados no fígado, estando de acordo com o que Chihai *et al.* (2015) e Umhang *et al.* (2014) encontraram na Moldávia, onde o ciclo de vida cão-ovelha era o mais prevalente, tal como em Portugal. A baixa fertilidade dos quistos de bovinos deve-se à idade de abate destes animais, que é muito superior à dos ovinos, e também ao tipo de pastagens onde estes animais circulam, sem a presença de canídeos (Alvarez Rojas *et al.*, 2014, Umhang *et al.*, 2014). Quanto aos caprinos, nas amostras obtidas em Portugal não foi possível encontrar quistos férteis porque por um lado as amostras eram em número reduzido e por outro os animais eram ainda muito jovens. Em relação à epidemiologia do quisto hidático nestes animais, não existem muitos trabalhos e os que existem apresentam baixo número de amostras quando comparados com outros estudos de hidatidose em bovinos ou ovinos (Youseffi *et al.*, 2013). A baixa taxa de parasitoses nos caprinos deve-se possivelmente à sua forma

de alimentação pois estes alimentam-se de folhas dos ramos mais distais das árvores onde existem menos ovos, logo o risco de se infectarem é menor (Otero-Abad e Torgerson, 2013)

O órgão mais afectado por esta parasitose, formando quistos hidáticos volumosos, é o fígado, seguido do pulmão e de outros órgãos internos, dado que este parasita pode parasitar qualquer tecido que seja irrigado pela rede de capilares sanguíneos (Gemmell *et al.*, 2001). No presente estudo houve um número muito semelhante de amostras parasitadas provenientes de fígado e de pulmão, porém, como o estudo não abrangeu todo o país, não se pode extrapolar acerca da prevalência num ou noutro órgão. Quanto a quistos férteis, eles apresentaram uma maior frequência em fígado de ovinos, o que está de acordo com resultados obtidos noutras partes do globo (Alvares Rojas *et al.*, 2014, Otero-Abad e Torgerson, 2013).

Neste estudo cerca de metade das amostras estavam calcificadas o que pode indicar que as medidas de controlo estão mais apertadas e os animais são alvo de maiores cuidados veterinários numa tentativa de diminuir a parasitose em Portugal.

A taxonomia do género *Echinococcus* tem sido bastante controversa ao longo dos anos devido à parca variabilidade morfológica encontrada nos parasitas adultos e à grande plasticidade do estadio larvar que se conseguiu desenvolver em diversos hospedeiros intermediários (Thompson e McManus, 2002). Segundo alguns autores, a especificidade para o hospedeiro intermediário seria um pressuposto bastante importante para se conseguirem delinear as espécies e estirpes constituintes deste género (Thompson *et al.*, 1995).

Assim, dentro da espécie *E. granulosus* tornou-se importante conhecer as estirpes da mesma que circulam em Portugal e as suas especificidades. A caracterização molecular tem grande importância no contexto de melhor avaliação do potencial impacto sobre a patologia, epidemiologia e medidas implementadas para o controlo da hidatidose (Nakao *et al.*, 2013). No presente trabalho foram usadas sequências parciais de genes mitocondriais e nucleares para avaliar as relações filogenéticas dentro do género *Echinococcus*.

Foi necessário otimizar o método de extracção de DNA por forma a se conseguir obter elevadas quantidades de DNA com a menor concentração possível de

contaminantes, de modo a não inibir a reacção de PCR. Para tal foram testados alguns métodos comerciais e um método clássico descrito por Sambrook *et al.* (1989) tendo-se optado por um método vendido pela Roche, pois com o mesmo obteve-se DNA em quantidade desejável para o trabalho e com pouca concentração de possíveis contaminantes da reacção de PCR. Em amostras com muito pouco material biológico disponível extraiu-se DNA pelo método clássico, pois esse método consegue extrair maiores concentrações de DNA, mas, com maior concentração de possíveis contaminantes. Das 76 amostras férteis obtidas para a realização do estudo molecular, e após extracção de DNA, apenas foi possível a amplificação de 72 amostras. As quatro amostras onde não foi possível amplificação apresentavam concentração de DNA muito baixa e tinham contaminantes, pelo que se esgotaram as mesmas. Assim, o presente estudo molecular incidiu sobre as 72 amostras recolhidas em animais abatidos em Portugal e sobre duas amostras enviadas do Brasil para comparação com as portuguesas e três amostras provenientes de Itália, descritas como *E. granulosus* G3, para melhor análise, comparação e compreensão dos resultados obtidos.

As 77 amostras foram caracterizadas, amplificando e sequenciando um fragmento do gene mitocondrial COI, tendo-se obtido com base em análise filogenética, 76 amostras pertencentes ao complexo G1-G3, denominado de *E. granulosus sensu stricto*, e uma amostra, obtida de um fígado de bovino que se encontrava no complexo G6-G10 com uma homologia de 100% para o genótipo G7, sendo esta a primeira referência a *E. canadensis* em Portugal num hospedeiro intermediário bovino. Esta estirpe é descrita como infecciosa, maioritariamente para o porco, mas com alguns casos comprovados de infecção em humanos (Ito *et al.*, 2014, Piccoli *et al.*, 2013) e encontra-se bem estabelecida na Europa com casos descritos dispersos em diversos países, como Espanha, França (Córsega), Alemanha, Itália, Grécia e Roménia, entre outros (Umhang *et al.*, 2014, Beyhan e Umur, 2011). Quanto à presença desta estirpe em bovinos não há publicações a referir presença neste hospedeiro intermediário, apenas em humanos, caprinos, suínos e javalis (Piccoli *et al.*, 2013). Existem evidências da presença do genótipo G6 em bovinos (Soriano *et al.*, 2010), o qual tem elevada homologia com o genótipo G7 e consequentemente com a amostra bovina portuguesa. Como ainda existem algumas

controvérsias quanto à posição taxonómica dos genótipos G6 e G7 e existe uma amostra, do presente estudo, que apresenta elevada homologia com o genótipo G7 é importante que se possa alargar o estudo molecular a outros genes para melhor caracterização desta amostra.

Todas as outras amostras foram caracterizadas como pertencentes ao complexo G1-G3 de *E. granulosus s.s.*, tendo na maioria dos casos 100% de homologia para sequências do genótipo G1. Com base na análise filogenética de sequências nucleotídicas de um fragmento do gene mitocondrial COI foram encontradas três amostras que eram segregadas juntamente com as amostras italianas, descritas como genótipo G3. Estes resultados levantaram a possibilidade de existência do genótipo G3 em três das amostras portuguesas, caracterizadas como provenientes de fígado de ovinos, todas do distrito de Castelo Branco. Este genótipo, previamente denominado de estirpe do búfalo, é actualmente descrito na literatura tanto como genótipo G1 como G2, não apresentando uma especificidade de hospedeiro intermediário, sendo infecciosa para o Homem (Thompson, 2008, Busi *et al.*, 2007, Guarnera *et al.*, 2004, Obwaller *et al.*, 2004). Contudo, a identificação concreta do genótipo pode providenciar informação acerca de possíveis rotas de transmissão e da localização de potenciais reservatórios (Calderini *et al.*, 2012, Thompson, 2008, Busi *et al.* 2007, Guarnera *et al.*, 2004, Obwaller *et al.*, 2004, Thompson e McManus, 2002, Rosenzvit *et al.*, 1999), dotando a sua caracterização molecular de elevada importância. Assim, se estas três amostras corresponderem ao genótipo G3, seria a primeira vez que este genótipo era descrito em Portugal, com as três amostras concentradas numa região do país, o que poderia implicar um estudo mais alargado nesta região e nas regiões limítrofes para uma melhor compreensão das características do mesmo e sua importância em Portugal.

Para uma melhor caracterização das amostras recolhidas foram amplificados fragmentos do gene mitocondrial ATP6 e dos genes ribossómicos 12S rRNA e 16S rRNA que vieram dar mais robustez à análise filogenética obtida com o fragmento do gene COI. Assim, ao concatenar as sequências dos fragmentos dos genes COI, ATP6, 12S rRNA e 16S rRNA conseguiu-se uma segregação do grupo que continha as três amostras portuguesas, com elevado suporte estatístico, levando a crer que serão mesmo amostras do genótipo G3 de *E. granulosus s.s.*. A análise filogenética

feita com as sequências nucleotídicas do fragmento do gene mitocondrial ATP6 demonstrou ter um elevado poder de segregação das diferentes espécies de *Echinococcus*, sempre estatisticamente suportada. A árvore filogenética obtida a partir da análise do fragmento 16S rRNA demonstrou ter um elevado poder discriminativo dentro do complexo *E. granulosus s.s.*, pois foi aquele onde se obteve um maior suporte estatístico na segregação do grupo de sequências pertencentes ao genótipo G3, facto que tinha sido sugerido em estudos anteriores (Wang *et al.*, 2015, Beato *et al.*, 2013).

A amostra humana proveniente de um rim foi caracterizada como sendo *E. granulosus s.s.* G1 com 100% de homologia com as sequências de referência. Sendo este o genótipo mais comum a nível mundial e o mais infeccioso para os humanos, há uma maior probabilidade de ser encontrado (Alvarez Rojas *et al.*, 2014, Piccoli *et al.*, 2013.). A localização do quisto humano no rim está estimada em cerca de 1-3% do total de quistos hidáticos encontrados em humanos, não sendo comum encontrar quistos neste órgão (Sachar *et al.*, 2014).

As relações filogenéticas inferidas a partir das sequências nucleotídicas individuais e concatenadas dos genes mitocondriais COI, ATP6 e dos 16S rRNA e 12S rRNA apresentaram algumas diferenças quanto à posição adoptada de algumas das espécies deste género na árvore filogenética. No gene 12S rRNA, que já foi descrito como o que apresenta menor variabilidade nucleotídica, segrega em primeiro lugar o complexo *E. canadensis*, seguido pelo *E. shiquicus* e depois as outras espécies, facto que não se repete em nenhuma das outras análises filogenéticas. Nas árvores filogenéticas geradas a partir dos fragmentos 16S rRNA e ATP6, que são os melhores candidatos para poderem ser utilizados como genes mitocondriais para distinção filogenética individualmente, a primeira espécie a segregar é o *E. shiquicus*, facto que se repete quando são concatenados os quatro fragmentos mitocondriais analisados, sugerindo que se trata de uma espécie irmã de todas as outras espécies do género *Echinococcus*. Esta análise vem a contradizer outros estudos que indicam que serão as espécies *E. oligarthrus* e *E. vogeli* os taxa basais das análises filogenéticas baseadas em genomas mitocondriais (Knapp *et al.*, 2011, Moro *et al.*, 2009, Saarma *et al.*, 2009, Xiao *et al.*, 2005, 2006). Este facto poderá ser devido ao tamanho das sequências nucleotídicas dos fragmentos de genes

mitocondriais utilizadas, pois no presente estudo foram usadas sequências com tamanhos entre 400–750 pb, que quando concatenadas deram origem a uma sequência nucleotídica com cerca de 2600 pb, enquanto que nos referidos estudos foram usadas sequências com mais de 5000 pb (Saarma *et al.*, 2009). Apenas na análise filogenética obtida a partir do gene COI (o gene mais utilizado para a caracterização molecular de *Echinococcus*) se encontra a espécie neotropical *E. oligarthrus* como a base da árvore, sendo uma espécie irmã para todas as outras (Knapp *et al.*, 2011).

Em todas as análises filogenéticas obtidas a partir dos genes mitocondriais foi revelado que o complexo *E. canadensis* e o *E. ortleppi* serão *taxa* irmãos, visto que em todas as árvores segregam juntos, sendo esta informação estatisticamente suportada, dados que também já foram comprovados noutros estudos (Nakao *et al.*, 2013, Knapp *et al.*, 2011, Saarma *et al.*, 2009, Moro *et al.*, 2009, Nakao *et al.*, 2007). Em todas as árvores filogenéticas se pode verificar que os vários genótipos que compõem o complexo *E. canadensis* G6-G10 são bastante próximos entre eles, sendo difícil encontrar diferenças no genoma dos mesmos. Actualmente existe alguma controvérsia na classificação do complexo *E. canadensis*, sendo este complexo composto por quatro genótipos diferentes, G6, G7, G8 e G10, classificados como geneticamente relacionados e com baixa a moderada taxa de infecciosidade para o humano (Piccoli *et al.*, 2013). Segundo Lymbery *et al.* (2015), as relações filogenéticas entre os genótipos que compõem este complexo estão bem definidas, mas a sua classificação taxonómica continua rodeada de alguma controvérsia, existindo evidências que os genótipos G6 e G7 representam uma única espécie, que difere tanto de G8 como de G10. Estes autores também referem que os genótipos G8 e G10 apresentam diferentes trajetórias evolutivas podendo ser considerados como espécies diferentes (Lymbery *et al.*, 2015). Estes pressupostos também já foram defendidos por outros autores (Yang *et al.*, 2015, Nakao *et al.*, 2013).

A topologia das árvores filogenéticas obtidas da análise dos fragmentos de genes nucleares veio demonstrar ser semelhante às análises feitas anteriormente por outros investigadores (Nakao *et al.*, 2013, Knapp *et al.*, 2011, Saarma *et al.*, 2009). Estas têm por base *E. vogeli* e *E. oligarthrus* e mostraram que *E. felidis* e o complexo *E. granulosus* são geneticamente mais semelhantes do que com as outras espécies de

Echinococcus. Esta informação já tinha sido discutida aquando da descoberta de uma estirpe típica do leão que parecia não se enquadrar como um genótipo de *E. granulosus* (Hüttner *et al.*, 2008) apesar de continuar a ser necessária investigação molecular e morfológica desta estirpe do leão.

A análise feita a partir das sequências nucleotídicas dos fragmentos dos genes nucleares EF1a e ELP veio demonstrar que alguns pares de espécies poderão ser classificados como *taxa* irmãos (*E. oligarthrus* com *E. vogeli*; *E. shiquicus* com *E. multilocularis*; *E. canadensis* com *E. ortleppi*). Com base nesta análise consegue-se inferir que *E. oligarthrus* e *E. vogeli* são *taxa* irmãos de todas as outras espécies de *Echinococcus*, tal como já tinha sido descrito por Knapp *et al.* 2011. Estes resultados foram todos suportados por elevados valores de probabilidade *a posteriori*. Quanto às espécies *E. felidis* e *E. granulosus s.s.*, ainda serão necessários outros estudos para comprovar se são também *taxa* irmãos.

A análise feita com base nos fragmentos dos genes nucleares veio dar maior suporte à probabilidade encontrada na análise do genoma mitocondrial de *E. oligarthrus* ser uma espécie irmã de todos os outros *Echinococcus*. Além desta informação, a filogenia com base em genes nucleares indica que *E. oligarthrus* e *E. vogeli* são espécies irmãs e que ambas serão espécies irmãs para todos os outros *taxa* de *Echinococcus* (Nakao *et al.*, 2013, McManus, 2013, Knapp *et al.*, 2011). Existem algumas incongruências quanto às relações entre *E. shiquicus* e *E. multilocularis*, que muitos autores dizem serem espécies irmãs, como já referido, sendo necessários mais estudos no sentido de aprofundar o conhecimento destas duas espécies. Quanto ao *E. granulosus s.s.* pensa-se que forma juntamente com *E. equinus*, *E. ortleppi* e o complexo *E. canadensis*, um conjunto críptico de espécies parafiléticas (Knapp *et al.*, 2011) e não espécies monofiléticas como tinha sido anteriormente apontado (Saarma *et al.*, 2009). No presente estudo encontramos algumas discrepâncias entre os diversos fragmentos sequenciados sendo necessárias mais análises para se conseguir resolver a filogenia do género *Echinococcus*.

No presente trabalho foi feito um estudo dos quistos hidáticos provenientes de vários matadouros no Centro de Portugal e Alto Alentejo tendo sido possível caracterizar algumas destas amostras recorrendo a técnicas de Biologia Molecular.

Estas amostras demonstraram pertencer a dois complexos de *Echinococcus*: o *E. granulosus s.s.* e o *E. canadensis*, existindo dentro do complexo *E. granulosus s.s.* divergência de três amostras juntamente com as amostras do genótipo G3 provenientes de búfalos de Itália.

De todas as amostras estudadas apenas uma provém de um humano sendo importante, no futuro, estudar mais amostras provenientes de humanos e conhecer os genótipos das mesmas, tal como tem sido feito noutros países.

Quanto aos genótipos encontrados no presente estudo (G1/G2, G3 e G6/G7) estes são descritos por toda a Europa, tanto em animais como em humanos (Piccoli *et al.*, 2013), sendo o genótipo G1 do *E. granulosus s.s.* o mais comum em toda a Europa e aquele que apresenta maior risco de infecciosidade para o humano (Umhang *et al.*, 2014).

Como referido anteriormente, o *E. granulosus s.s.* é o genótipo mais infeccioso para o Homem sendo de extrema importância a realização de estudos epidemiológicos moleculares em Portugal. No presente estudo apenas foi possível aceder a alguns matadouros de Portugal sendo importante alargar o estudo a todo o território de forma a obter dados da real situação epidemiológica do país em relação a esta parasitose, no que concerne aos hospedeiros intermediários. Esta parasitose traz aos produtores elevadas perdas monetárias e a todos os seres vivos risco de serem parasitados e desenvolver a doença, que é responsável por diversas comorbilidades. Também será importante, juntamente com os clínicos que acompanham doentes com esta parasitose, conseguir obter informação sobre a real incidência da mesma no ser humano, pois apesar de existir um relatório recente, este apenas apresenta resultados parciais (Reis *et al.*, 2014), sendo necessário alargar o mesmo a todo o país.

No que diz respeito ao hospedeiro definitivo canino existem alguns estudos recentes realizados na região centro e norte de Portugal (Cardoso *et al.*, 2014, Mateus *et al.*, 2014, Guerra *et al.*, 2013), não tendo sido possível obter o acesso a nenhum estudo que consiga contemplar todo o país. Um estudo epidemiológico destes seria muito importante pois o cão continua a ser um animal de guarda utilizado na pastorícia.

Conjuntamente com os estudos epidemiológicos seria importante fazer a caracterização molecular das amostras obtidas para se realizar um estudo das estirpes existentes em todo o território e a partir destes delinear melhores estratégias de combate à parasitose, pois consoante as estirpes circulantes assim poderá ser a estratégia a utilizar ao nível da Saúde Pública. A importância do conhecimento das estirpes prende-se com o facto de estas poderem ser mais ou menos infecciosas para o ser humano, desenvolverem-se mais ou menos céleres e terem especificidades para determinados hospedeiros intermediários (Gemmell *et al.*, 2001).

Assim o presente trabalho trouxe conhecimento acerca desta parasitose em Portugal, ao nível da caracterização molecular, mas será apenas um contributo para o conhecimento da situação de Portugal e um estímulo para a continuação dos trabalhos.

Referências bibliográficas

- ALVAREZ ROJAS, C. A., ROMIG, T., & LIGHTOWLERS, M. W. 2014. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans-review of current knowledge. *Int J Parasitol*, 44, 9-18.
- BEATO, S., PARREIRA, R., ROQUE, C., GONÇALVES, M., SILVA, L., MAURELLI, M.P., CRINGOLI, G., & GRÁCIO, M. A. 2013. *Echinococcus granulosus* in Portugal: The first report of the G7 genotype in cattle. *Vet Parasitol*, 198, 235-239.
- BEYHAN, Y.E., UMUR, S. 2011. Molecular characterization and prevalence of cystic echinococcosis in slaughtered water buffaloes in Turkey. *Vet. Parasitol*, 181, 174-179.
- BUSI, M., SNABEL, V., VARCASIA, A., GARIPPA, G., PERRONE, V., DE LIBERATO, C., & D'AMELIO, S. 2007. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol*, 150, 75-83.
- CALDERINI, P., GABRIELLI, S., & CANCRINI, G. 2012. Is the goat a new host for the G3 Indian buffalo strain of *Echinococcus granulosus*? *ScientificWorldJournal*, 2012, 286357.
- CARDOSO, A. S., COSTA, I. M., FIGUEIREDO, C., CASTRO, A., & CONCEICAO, M. A. 2014. The occurrence of zoonotic parasites in rural dog populations from northern Portugal. *J Helminthol*, 88, 203-209.
- CHIHAI, O., UMHANG, G., ERHAN, D., BOUÉ, F., TĂLĂMBUȚĂ, N., RUSU, Ș., & ZAMORNEA, M. 2015. Slaughterhouse survey of cystic echinococcosis in cattle and sheep from the Republic of Moldova. *J Helminthol*, 1-5.
- DAVID DE MORAIS, J.A. 2010. The rise and decline of human hydatid disease in Portugal: historical and epidemiological analysis. *Med Int*, 17, 246-256.
- GEMMELL, M. A., ROBERTS, M. G., BEARD, T. C., & LAWSON, J.R. 2001. Epidemiology: Quantitative epidemiology and transmission dynamics with special reference to *Echinococcus granulosus*. eds. WHO/OIE Manual on

Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. *Office Internationales Epizooties*.

- GUARNERA, E. A., PARRA, A., KAMENETZKY, L., GARCIA, G., & GUTIERREZ, A. 2004. Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. *Acta Trop*, 92, 153-159.
- GUERRA, D., ARMUA-FERNANDEZ, M. T., SILVA, M., BRAVO, I., SANTOS, N., DEPLAZES, P., & CARVALHO, L. M. 2013. Taeniid species of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in Portugal with special focus on *Echinococcus* spp. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 2, 50-53.
- HÜTTNER, M., NAKAO, M., WASSERMANN, T., SIEFERT, L., BOOMKER, J. D., DINKEL, A., & ITO, A. 2008. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol*, 38, 861-868.
- ITO, A., DORJSUREN, T., DAVAASUREN, A., YANAGIDA, T., SAKO, Y., NAKAYA, K., CHULUUNBAATAR, G. 2014. Cystic echinococcoses in Mongolia: molecular identification, serology and risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2937.
- KNAPP, J., NAKAO, M., YANAGIDA, T., OKAMOTO, M., SAARMA, U., LAVIKAINEN, A., & ITO, A. 2011. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Mol Phylogenet Evol*, 61, 628-638.
- LYMBERG A. J., JENKINS E. J., SCHURER J.M., & THOMPSON, R.C. 2015. *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name?. *Trends in Parasitology*, 31, 121-126.
- MATEUS, T. L., CASTRO, A., RIBEIRO, J. N., & VIEIRA-PINTO, M. 2014. Multiple Zoonotic Parasites Identified in Dog Feces Collected in Ponte de Lima, Portugal-A Potential Threat to Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11, 9050-9067.

- MCMANUS, D.P. 2013. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology*, 140, 1617–1623.
- MORO, P., & SCHANTZ, P. M. 2009. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis*, 13, 125-133.
- NAKAO, M., MCMANUS, D. P., SCHANTZ, P. M., CRAIG, P. S., & ITO, A. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, 134, 713-722.
- NAKAO, M., YANAGIDA, T., KONYAEV, S., LAVIKAINEN, A., ODNOKURTSEV, V. A., ZAIKOV, V. A., & ITO, A. 2013. Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology*, 140, 1625-1636.
- OBWALLER, A., SCHNEIDER, R., WALOCHNIK, J., GOLLACKNER, B., DEUTZ, A., JANITSCHKE, K., ASPOCK, H., AUER, H. 2004. *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology*, 128, 569–575.
- OTERO-ABAD, B., & TORGERSON, P. R. 2013. A systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2249.
- PICCOLI, L., BAZZOCCHI, C., BRUNETTI, E., MIHAILESCU, P., BANDI, C., MASTALIER, B., CRETU, C. 2013. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in south-eastern Romania: evidence of G1-G3 and G6-G10 complexes in humans. *Clin Microbiol Infect*, 19, 578-582.
- REIS T., VILARES, A., FERREIRA, I., MARTINS, S., FURTADO, C. & GARGATÉ, M. J. 2014. Hidatidose quística humana: análise retrospectiva de casos diagnosticados e em monitorização entre 2008 e 2013. *Observações Boletim Epidemiológico*, 8, 30-33.
- ROZENZVIT, M. C., ZHANG, L. H., KAMENETZKY, L., CANOVA, S. G., GUARNERA, E. A., MCMANUS, D. P. 1999. Genetic variation and

- epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology*, 118, 523–30.
- SAARMA, U., JOGISALU, I., MOKS, E., VARCASIA, A., LAVIKAINEN, A., OKSANEN, A., MARAVILLA, P. 2009. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology*, 136, 317-328.
- SACHAR, S., GOYAL, S., GOYAL, S., & SANGWAN, S. 2014. Uncommon locations and presentations of hydatid cyst. *Ann Med Health Sci Res*, 4, 447-452.
- SAMBROOK J, FRITSCH F, MANIATIS T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- SORIANO, S. V., PIERANGELI, N. B., PIANCIOLA, L., MAZZEO, M., LAZZARINI, L. E., SAIZ, M. S., BASUALDO, J. A. 2010. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquen, Patagonia Argentina. *Parasitol Int*, 59, 626-628.
- THOMPSON, R. C. 2008. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*, 119, 439-446.
- THOMPSON, R. C., LYMBERY, A. J., & CONSTANTINE, C. C. 1995. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol*, 35, 145-176.
- THOMPSON, R. C., & MCMANUS, D. P. 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*, 18, 452-457.
- UMHANG, G., CHIHAI, O., & BOUÉ, F. 2014. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in a hyperendemic European focus, the Republic of Moldova. *Parasitol Res*, 113, 4371-4376.
- UMHANG, G., RICHOMME, C., HORMAZ, V., BOUCHER, J. M., & BOUE, F. 2014. Pigs and wild boar in Corsica harbor *Echinococcus canadensis* G6/7 at levels of concern for public health and local economy. *Acta Trop*, 133, 64-68.

- WANG, N., WANG, J., HU, D., ZHONG, X., JIANG, Z., YANG, A., YANG, G. 2015. Genetic variability of *Echinococcus granulosus* based on the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *Mitochondrial DNA*, 26, 396-401.
- YANG, D., ZHANG, T., ZENG, Z., ZHAO, W., ZHANG, W., & LIU, A. 2015. The first report of human-derived G10 genotype of *Echinococcus canadensis* in China and possible sources and routes of transmission. *Parasitol Int*, 64, 330-333.
- YOUSSEFI, M. R., TABARIPOUR, R., OMRANI, V. F., SPOTIN, A., & ESFANDIARI, B. 2013. Genotypic characterization of *Echinococcus granulosus* in Iranian goats. *Asian Pac J Trop Dis*, 3, 362-366.
- XIAO, N., QIU, J., NAKAO, M., LI, T., YANG, W., CHEN, X., ITO, A. 2006. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: discovery and epidemiological implications. *Parasitol Int*, 55, S233-236.
- XIAO, N., QIU, J., NAKAO, M., LI, T., YANG, W., CHEN, X., ITO, A. 2005. *Echinococcus shiquicus* sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol*, 35, 693-701.