ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

A subespeciação do *Echinococcus granulosus* em Portugal

The subspeciation of Echinococcus granulosus in Portugal

/ J. A. David de Morais

Doutoramento e agregação em Parasitologia
Consulta de Hidatidologia do Hospital do Espírito Santo de Évora

Correspondência:

J. A. David de Morais
Rua José Régio, 36
7005-537 Évora

Telefone: +351 266751848
e-mail: joao.morais.10@netvisao.pt

/ Resumo

Desde a criação, em 1786, por Batsch, da espécie *Hydatigena granulosa*, a problemática da especiação e subespeciação em Hidatidologia tem sido objecto de considerável controvérsia. Todavia, depois dos progressos taxonómicos conseguidos com as técnicas morfológicas (até há bem pouco tempo muito valorizadas), o recurso recente às potencialidades da Biologia Molecular veio permitir uma melhor compreensão da filogenia das estirpes do *Echinococcus granulosus*, com benefícios consideráveis no domínio clínico face ao reconhecimento da maior ou menor patogenicidade dos possíveis genótipos presentes em cada região.
Neste trabalho, o autor historia a evolução taxonómica do género *Echinococcus*, e descreve o "estado da arte" em Portugal sobre o conhecimento dos genótipos de *E. granulosus* presentes em território nacional.

Palavras-chave: hidatidose, especiação, subespeciação, Portugal.

/ Abstract

Since the establishment, in 1786, by Batsch, of the Hydatigena granulosa species, the problem of speciation and subspeciation in Hydatidology has been the subject of considerable controversy. However, after the progress achieved with the taxonomic morphological techniques (until quite recently highly valued), the recent appeal to the potential of Molecular Biology has enabled a better understanding of the phylogeny of the strains of Echinococcus granulosus, with considerable benefits in the clinical domain given the recognition of higher or lower pathogenicity of genotypes present in each region.
In this paper, the author describes the taxonomic history evolution of the genus Echinococcus and "the state of the art" in Portugal regarding the knowledge of the genotypes of E. granulosus

Key-words: *hydatid disease, speciation, subspeciation, Portugal.*

/ Introdução

O *Echinococcus granulosus*, única espécie do género *Echinococcus* presente em Portugal, tem como hospedeiros definitivos os canídeos e como hospedeiros intermediários vários herbívoros domésticos. No hospedeiro definitivo desenvolve-se a forma adulta do parasita, com a sua morfologia típica de um Taeniidae, e no hospedeiro intermediário desenvolve-se a forma larvar ou metacéstodo. Acidentalmente, quando o homem ingere ovos de *E. granulosus* poderá desenvolver a forma larvar ou quisto hidático.[1]

No nosso país, esta zoonose parasitária já se revestiu de grande acuidade epidemiológica e clínica, muito em especial na região do Alentejo.[2,3,4] Todavia, a parasitose tem vindo a decrescer, sobretudo face às mudanças socioeconómicas ocorridas no meio rural e à alteração das práticas de maneio de gados (redução drástica dos cães de pastoreio, recurso a parques de criação vedados a arame farpado, etc.).[5,6,7]

A nível mundial, diversos autores consideram que, em vários países, as diferentes espécies de *Echinococcus* conhecem um período de re-emergência.[8,9,10]

Face ao interesse crescente da "abordagem clínica integrada" ou "abordagem clínica holística", assente na tríade agente infeccioso/hospedeiro/terapêutica,[11,12,13] é manifesto que, no caso específico da Hidatidose, o estudo dos genótipos de *E. granulosus* presentes no país se reveste de particular interesse para uma prática racional da medicina hidatidológica, razão que determinou a elaboração deste trabalho.

/Especiação e subespeciação do género *Echinococcus*

Já Hipócrates (460-357 a.C.), na Grécia Antiga, se interrogava sobre a verdadeira natureza dos "tumores do fígado repletos de água" ("*jecur aquâ repletum*"): seriam de origem natural ou divina?[14] Hoje em dia, sabemos que tais "tumores brancos" correspondem a quistos hidáticos, contendo líquido hidático, isto é, à forma larvar do *Echinococcus*.

Obscura é a origem do género *Echinococcus*, mas, filogeneticamente, parece ter-se originado da "forma nórdica" (paleártica) que, a partir do ciclo silvático (lobo/cervídeos) evoluiu para um ciclo sinantrópico (cão/cervídeos), acabando, por fim, por determinar um ciclo doméstico (cão/herbívoros domésticos), que do meio rural extravasou mesmo para o meio urbano.[2,4]

Desde que, em 1786, Batsch propôs a criação da espécie *Hydatigena granulosa*, a problemática da especiação e subespeciação do género *Echinococcus* prestou-se a controvérsias, quer no que respeita à nomenclatura (*Polycephalus hominis* Zeder 1803, *Polycephalus echinococcus* Zeder 1803, *Taenia cateniformis* (*cucumerina* Bloch) Rudolphi 1810, *Echinococcus hominis* (Zeder 1800) Rudolphi 1810, etc., etc.),[2,4] quer no que respeita ao número de supostas espécies (só entre 1910 e 1927 foi proposta a criação de 14 espécies de *Echinococcus*). Assim, apesar de um vasto acervo de investigações sugerindo a criação e a anulação de um número considerável de espécies de *Echinococcus*, a WHO acabou por aceitar apenas a existência de quatro espécies:[15,16]

- *E. granulosus* (Batsch 1786): tem distribuição praticamente por todo o Planeta, sendo que a colonização portuguesa e espanhola contribuíram para a sua disseminação. Esta espécie teria chegado à Austrália a partir do contrabando de ovelhas merinas de Portugal para a Inglaterra, donde seguiram depois para o continente australiano (antes, tinham sido contrabandeadas de Espanha para Portugal).[3] Tem como ciclo principal canídeos/herbívoros.
- *E. multilocularis* (Leuckart 1863): presente na Europa do Centro e Leste, Ásia e América do Norte. O ciclo principal interessa raposas/muróides.
- *E. vogeli* (Rausch *et* Bernstein 1972): ocorre na América Central e América do Sul. O seu ciclo é predominantemente silvático (admite-se a ocorrência de um ciclo sinantrópico),



tendo como hospedeiro definitivo o *Icticyon venaticus* (e também o cão doméstico, mas com menor relevância) e como hospedeiro intermediário o *Cuniculus paca*. No homem, produz grandes disseminações hepáticas e peritoneais.[17,18]

- *E. oligarthrus* (Diesing 1863): distribui-se sensivelmente pelas mesmas áreas geográficas da espécie anterior. Só é conhecido o ciclo silvático, tendo como hospedeiros definitivos felídeos (*Felis concolor*, *F. onca*, etc.) e como hospedeiros intermediários alguns roedores selvagens (*Dasyprocta agouti* e *D. punctata*). Apresenta patogenicidade sobreponível à do *E. vogeli*.[17,18]

Recentemente, foi descrita uma nova espécie nos planaltos do Tibete, o *E. shiquicus*, mas desconhece-se a sua eventual implicação a nível humano.[19]

A proliferação de espécies de *Echinococcus* outrora propostas resultou do facto de então se usarem nos estudos taxonómicos fundamentalmente critérios apenas morfológicos de tipificação dos parasitas. Todavia, presentemente os estudos genéticos, por recurso a técnicas de Biologia Molecular, vieram permitir aclarar muitas dúvidas, quer no campo da especiação quer no da subespeciação.

No que respeita à Europa, é aqui reconhecida apenas a existência do *E. granulosus* e do *E. multilocularis*, este último em expansão na Europa Central, onde, devido à protecção dispensada às raposas, tem vindo a expandir-se, criando problemas mesmo a nível urbano.[20]

Quanto à Península Ibérica, ela tornou-se tradicionalmente uma região de grande endemicidade do *E. granulosus*, devido ao incremento da criação e transumância do carneiro merino.[3,21] Refira-se, todavia, que em Espanha foi assinalada a hipotética ocorrência de infecção humana por *E. multilocularis*,[22] mas essa questão tem suscitado dúvidas, carecendo ainda de um cabal esclarecimento. No que respeita ao nosso país, existe aqui tão-só a espécie *E. granulosus*, e o único caso humano referido de infecção pelo *E. multilocularis* era reconhecidamente de importação: tratava-se de um paciente que residira em França e na Suíça.[23]

A problemática da subespeciação suscitou – e suscita ainda – questões pertinentes, não completamente dilucidadas, tanto mais que a metodologia taxonómica utilizada foi sofrendo valorizações e desvalorizações sucessivas. Outrora, consideravam-se, em especial:

- **Morfologia**: tem sido criticada pelo facto de poder reflectir apenas adaptações fenotípicas a diferentes ecossistemas, e não verdadeiras variações genotípicas. Todavia, baseando-se em características

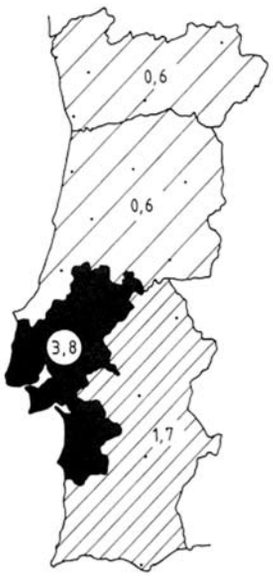

Figura 1 – Índices de rejeições de vísceras de ovinos com quistos hidáticos, por regiões, no quarto de século 1944-1968 (reproduzido de David de Morais, 1998).[4]

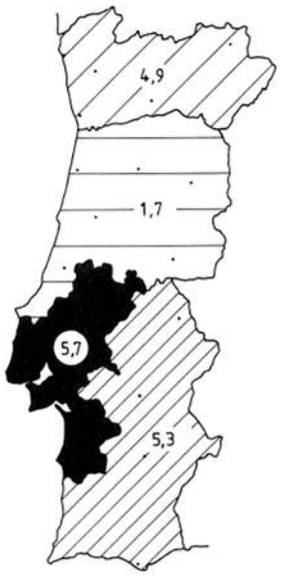

Figura 2 – Índices de rejeições de vísceras de bovinos adultos com quistos hidáticos, por regiões, no quarto de século 1944-1968 (reproduzido de David de Morais, 1998).[4]

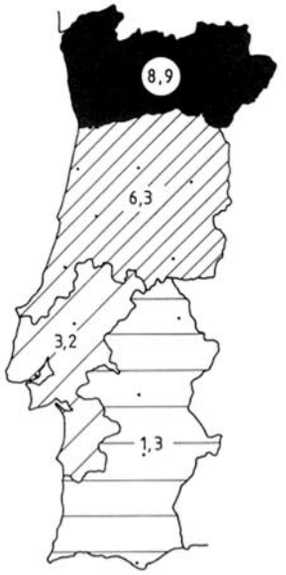

Figura 3 – Índices de rejeições de vísceras de suínos com quistos hidáticos, por regiões, no quarto de século 1944-1968 (reproduzido de David de Morais, 1998).[4]

morfológicas de vermes adultos, Thompson e colab. (1984) individualizaram a estirpe bovina na Suíça.[24]

- **Epidemiologia**: revelou-se importante no discernimento dos hospedeiros definitivos e intermediários implicados na transmissão de estirpes distintas, como ocorreu, por exemplo, na Austrália com os ciclos cão/ovelha e dingo/marsupiais, onde "(...) *the two cycles have the potencial to interact.* (...)"[25]
- **Fertilidade dos metacéstodos**: a ocorrência, em hospedeiros intermediários distintos, de índices de fertilidade baixos ou altos nos quistos hidáticos pode indicar a existência de estirpes diferentes de *E. granulosus*. Com efeito, a estirpe ovina produz, em geral, hidátides estéreis ou degeneradas nos bovinos, sendo que a estirpe bovina produz nesta espécie quistos férteis.
- **Bioquímica**: por exemplo, os lípidos e polissacáridos são mais abundantes na estirpe equina do que na ovina.[26]
- **Experimentação *in vivo***: a título exemplificativo, diremos que a infecção experimental de cães permitiu determinar a existência de uma estirpe suína na Polónia, Bielorrússia e Bulgária.[27]
- **Cultura de protoescólices *in vitro***: a cultura de protoescólices *in vitro*, em meio difásico, permite a evolução do parasita para verme adulto (em meio monofásico conduz antes à vesiculação), mas nas estirpes equina e bovina não ocorre estrobilização; na estirpe caprina, verifica-se estrobilização, mas não diferenciação sexual; todavia, na estirpe ovina, além da estrobilização ocorre também maturação sexual do parasita.[2,4]
- **Patogenicidade para o homem**: entre outros aspectos, ocorre-nos referir que, a meio do século passado, a prevalência da hidatidose em cavalos na Inglaterra aumentou de 35 para 60%,[28] com o correlativo aumento também da equinococose canina, e, todavia, não se verificou nenhum acréscimo de casos humanos; na Polónia, onde domina a estirpe suína, a hidatidose humana é uma raridade: "(...) *In the Poznan area, 31% of pigs and 11% of dogs on private farms were found to be infected with* E. granulosus *but only one case of human echinococcosis was diagnosed at the local hospital during 20 years.* (...)",[29] etc.
- **Genética**: a genética é actualmente a grande 'ferramenta' de estudo da especiação e da subespeciação: "(...) *To avoid arbitrary and misleading designation of strains, the differences (...) should have a genetic basis (...). The discriminatory power of biochemical and molecular techniques, and their growing acceptance in taxonomic determination, have provide the tools necessary for recognition and characterization of variants within the recognized species of* Echinococcus (...)."[30]

Em Biologia Molecular, no que respeita aos marcadores genéticos, existem dois grandes domínios: a análise isoenzimática dos *loci* e a análise do DNA, após amplificação.

Dado que o estudo isoenzimático permite o recurso a um grande número de enzimas – por exemplo, Le Riche *et* Sewell (1978) utilizaram apenas uma enzima,[31] enquanto Lymbery *et* Thompson (1988) utilizaram 30 enzimas diferentes.[32] – técnica isoenzimática permitiu obter resultados muito assinaláveis no estudo da subespeciação do *E. granulosus*.

Modernamente, contudo, a análise genómica das espécies assenta principalmente no estudo do DNA, por recurso à técnica do PCR (*polymerase chain reaction*).

Todavia, alguma polémica surgiu, tendo por base o argumento da exiguidade do segmento de DNA analisado com as sondas correntemente empregues. Lymbery *et* Thompson (1991), por exemplo, lembram que, por exemplo, por recurso a 20 enzimas é possível abranger cerca de 2000 nucleótidos do material parasitário analisado, enquanto com as sondas empregues actualmente na análise genómica só são passíveis de estudo 288 nucleótidos, se bem que o seu número possa vir a ser aumentado no futuro.[33] E para Eckert (1991), "(...) *the DNA restriction fragment-length analysis is not (or not yet) applicable as a single and relatively simple diagnostic tool for the diagnosis of strain differences* (...)."[34]

Em relação aos parâmetros de diferenciação intra-específica, utilizámos neste trabalho, sinonimicamente, os vocábulos subespécie e estirpe (*strain*, em inglês; *souche*, em francês; *ceppo*, em italiano; *cepa*, em castelhano). Todavia, quando essa diferenciação decorre apenas da utilização de métodos de Biologia Molecular, passou a utilizar-se antes a designação genótipo. Assim, com base em múltiplos estudos realizados, admite-se, hoje em dia, a existência dos seguintes 10 genótipos no complexo *E. granulosus*:[35,36,37]

- **Genótipo 1 (G1): estirpe ovina comum**
- Genótipo 2 (G2): estirpe ovina da Tasmânia
- Genótipo 3 (G3): estirpe do búfalo
- Genótipo 4 (G4): estirpe do cavalo (*E. equinus*)
- **Genótipo 5 (G5): estirpe bovina (*E. ortleppi*)**
- Genótipo 6 (G6): estirpe do camelo
- Genótipo 7 (G7): estirpe suína
- **Genótipo 8 (G8): estirpe dos cervídeos**
- Genótipo 9 (G9): estirpe polaca porco/homem
- Genótipo 10 (G10): estirpe cervídea Fennoscandinava

Ora, a determinação, em cada país e região endémica de equinococose-hidatidose dos genótipos aí existentes, reveste-se de grande importância epidemiológica, profilática e clínica, dado que se aceita que existem estirpes que são patogénicas para o homem, enquanto outras não o são ou apenas se revestem de patogenicidade negligenciável. À luz dos conhecimentos actuais, são considerados patogénicos para o homem tão-só os genótipos ovino (G1), bovino (G5) e cervídeo (G8): "(...) *The so-called sheep, cattle and cervid strains of* E. granulosus *are infective to humans, while the horse, camel and pig strains may be less or not infective* (...)".[38] Destes três genótipos, o ovino (G1) é tido como o mais patogénico para o homem, sendo que, infelizmente, é também o que possui a mais ampla difusão mundial.[2]

/ Escorço sobre o conhecimento actual da subespeciação do *E. granulosus* em Portugal

Comecemos por referir que os estudos epidemiológicos nos permitiram, de certo modo, antecipar qual a situação do nosso país no que respeita aos genótipos de *E. granulosus* aqui presentes. Analisando, nas estatísticas oficiais dadas à estampa, as rejeições em matadouros das vísceras contaminadas por quistos hidáticos durante um quarto de século (1944-1968), apurámos os índices de contaminação, expressos nas Figs 1, 2 e 3. Os índices de

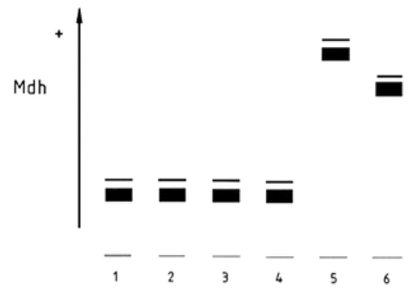

Figura 4 – Zimograma do *locus* MDH. Amostras de quistos hidáticos de: 1: ovelha, Portugal; 2: boi, Portugal; 3: ovelha, Itália; 4: boi, Itália; 5 e 6: tecidos de órgãos de ovelha e boi (controlo) – reproduzido de David de Morais, 1998.[4]

rejeição que calculámos basearam-se nas inspecções sanitárias feitas, em todo o País, em 36 050 851 animais: 16 497 143 ovinos, 5 340 582 caprinos, 2 725 531 bovinos e 11 487 595 suínos (por economia de espaço, não reproduzimos aqui a Fig. respeitante aos caprinos, mas ela não difere, no essencial, da dos ovinos).[2,4] Na análise interpretativa das Figs 1, 2 e 3 deveremos, todavia, abster-nos de considerar os índices de rejeições da Região de Lisboa: é que os animais ali abatidos não são criados nessa Região, mas provêm, sim, dos circuitos de comercialização que para ali canalizam gados para consumo citadino.[2,3,4]

Assim, a análise da Fig. 1 permite a conclusão óbvia de que nos ovinos (o mesmo se passa com os caprinos) a hidatidose cresce, notoriamente, de norte para sul. Quanto aos bovinos (Fig. 2), embora os maiores índices de rejeição tivessem sido registados na Região Sul, eles já apresentam, todavia, valores expressivos na Região Norte. Por fim, no que respeita aos suínos (Fig. 3), a Região Norte supera, significativamente (sete vezes mais), a Região Sul, mas esta espécie acusa também valores muito importantes na Região Centro.

Do exposto resulta bem evidente que a maior biomassa parasitária de *E. granulosus* circula na Região Norte – que é, comparativamente, a de mais exíguo território e de grande densidade populacional, factos relevantes – pelo que seria de esperar que na zona

setentrional do País se registasse a maior incidência de hidatidose humana, face à evidente conspurcação do meio por ovos de *Echinococcus*. Ora, sucede que a Região Norte é exactamente aquela que detém a menor incidência de hidatidose humana! [2,3,4,5,6,7,39,40]

Crescendo em Portugal a hidatidose humana de norte para sul (o Alentejo sempre foi a região de grande endemicidade hidática no País, sendo o distrito de Évora o único com incidência hiper-endémica),[4,5] e crescendo, inversamente, a hidatidose animal de sul para norte, pudemos, em bases epidemiológicas, deduzir que a sul deveria prevalecer uma estirpe de *E. granulosus* de grande patogenicidade, enquanto a norte, contrariamente, deveria prevalecer uma estirpe não patogénica ou de baixa patogenicidade. Ou, coerentemente: na Região Sul – a mais infectada por quistos hidáticos no homem – presumivelmente deveria prevalecer a estirpe ovina (G1), enquanto nas Regiões Centro e Norte – onde a prevalência da hidatidose humana é de diminuta importância – presumivelmente deveria prevalecer a estirpe suína (G7). Fazemos notar que grafámos "prevalecer", o que nos leva a pressupor a possível coexistência de estirpes diferentes num mesmo espaço territorial, mas com dominância de uma delas, reflectindo-se, pois, clinicamente, nos valores da incidência humana desta zoonose parasitária.

No sentido de testarmos a nossa hipótese epidemiológica, efectuámos em Roma, em colaboração com a Professora Lia Paggi, do *Istituto di Parassitologia* da Universidade "*La Sapienza*", estudos genéticos de quistos hidáticos de ovinos e bovinos (fígado e pulmão), que recolhemos nos matadouros de Beja e de Vila Franca de Xira (aqui, os quistos hidáticos eram de animais provenientes da zona de Santarém); para comparação, analisaram-se também quistos hidáticos da Itália Continental (Lazio) e da Sardenha. De acordo com o estado da arte de então (vide supra), recorremos à técnica da electroforese isoenzimática.[41] No estudo foram utilizadas as seguintes 11 enzimas:[2,4,42] malato--desidrogenase (MDH): número da *Enzyme Commission* (E.C.) 1.1.1.37; málico-enzima (ME): E.C. 1.1.1.40; isocitrato-desidrogenase (IDH): E.C. 1.1.1.42; 6-fosfogluconato-desidrogenase (6PGD): E.C. 1.1.1.43; NADH-desidrogenase (NADH-DH): E.C. 1.6.99.3; superoxidase-dismutase (SOD): E.C. 1.51.1.1; glutamato-oxaloacetato-transaminase (GOT): E.C. 2.6.1.1; creatino-kinase (CK): E.C. 2.7.3.2; adenilato-kinase (AK): E.C. 2.7.4.3; manose-fosfato-isomerase (MPI): E.C. 5.3.1.8; e glucose-fosfato-isomerase (GPI): E.C. 5.3.1.9. Os pormenores técnicos e os resultados respeitantes aos *loci* analisados poderão ser compulsados em Mattiucci S, David de Morais JA e colab. (1991), e em David de Morais (1993; 1998).[2,4,42]

Dez enzimas revelaram zimogramas interpretáveis e reprodutíveis (tão-só a SOD não mostrou actividade valorizável). A mero título de exemplo, dentre as várias dezenas de zimogramas executados, reproduzimos na Fig. 4 o zimograma do *locus* enzimático MDH. Como conclusão final, salientamos a total homogeneidade de todo o material analisado: as bandas encontradas nas amostras quísticas de origem ovina eram sobreponíveis às bandas do material de origem bovina, sendo o cotejo entre as duas regiões abrangidas, Portugal e Itália, também perfeitamente coincidente, concluindo-se pela existência de uma única estirpe de *E. granulosus* interessando ambos os países, qual seja a estirpe cão/ovelha. Notaremos ainda que a identidade genética entre o material do Centro e Sul de Portugal e o da Itália confere bastante plausibilidade à hipótese que vimos defendendo: a romanização do País, face à importação coeva de animais para as *villae* romanas, poderá ter estado na origem de uma das vias de introdução da Hidatidose em Portugal (a outra via poderá ter sido a transumância de gados de Espanha para Portugal).[21,43,44]

Posteriormente, surgiram algumas investigações baseadas no isolamento de DNA de metacéstodos (relativamente aos trabalhos que a seguir indicamos, cumpre esclarecer que se sabe que alguns estudos têm sido apresentados em congressos, mas o facto é que não os encontrámos disponíveis, nem em publicações, nem na internet). D. Cartucho e colab. (2000), em colaboração com o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Madrid, numa comunicação a um congresso de Hidatidologia, referiram a identificação da "estirpe cão/ovelha", num caso humano de Castelo Branco.[45] L. Justo e colab. (2005), num quisto hidático de um ovino da zona do Algarve, identificaram a presença do genótipo G1.[46] A. Castro e colab. (2005) referiram ter efectuado "(...) *um estudo epidemiológico, em diferentes regiões do país* (...)", e que "(...) *os resultados obtidos até ao momento, demonstram a presença do genótipo G1 (em pequenos ruminantes) e G7 (em suínos)* (...)"; dado que o estudo incluiu colaboradores do "Matadouro Carnes de Vinhais" e "Matadouro Regional do Zêzere", presume--se que os suínos possam ter sido da Região Norte e Centro e os "pequenos ruminantes" talvez da Região Centro (Zêzere)[47] – os estudos do Centro de Imunologia e Biologia Parasitária, do Instituto Ricardo Jorge do Porto, assinalando nos concelhos de Vinhais (distrito de Bragança) e de Cantanhede (distrito de Coimbra) a presença em suínos da estirpe G7 foram objecto de um relatório interno.[48] Sílvia Beato (2008), numa dissertação de mestrado, estudou fígados e pulmões de ovinos e de bovinos, "na região centro de Portugal", e do estudo do seu DNA concluiu tratar-se, em ambas espécies, do genótipo G1.[49] Um estudo recente, de S. Beato e colab. (2010), respeitante a quistos hidáticos de ovinos e de bovinos da zona do Interior-Centro, revelou a ocorrência dos genótipos G1 e G3 ("estirpe do búfalo"); todavia, deverá evitar-se extrair daí ilações epidemiológicas e clínicas precipitadas, dado que a análise filogenética mostrou a possível existência de um *cluster* G1-G3.[50] Assim, é provável que a diferenciação genotípica das 10 estirpes do *E. granulosus*, actualmente reconhecidas, venha a ser revista no futuro, talvez com a criação de uma estirpe de *E. granulosus sensu stricto* (*cluster* G1,G2,G3), como aliás já foi sugerido, ou da estirpe *E. granulosus granulosus*.

/ Conclusões

Em concordância com estudos epidemiológicos e clínicos antes publicados,[2,3,4] que sugeriam a existência de uma estirpe de *E. granulosus* mais patogénica no sul do País (na verdade, na nossa Consulta de Hidatidologia do Hospital do Espírito Santo de Évora possuímos muitos casos de hidatidose de assinalável gravidade e tamanho)[5,11,51,52,53] e a predominância de uma estirpe menos patogénica no norte do território nacional (possuímos, na nossa Consulta, alguns doentes de Trás-os-Montes, com quistos hidáticos que há muitos anos se mantém quiescentes ou que responderam muito bem à terapêutica benzimidazólica)[5,6,7] – em concordância com esses estudos epidemiológicos e clínicos, dizíamos nós, diversas investigações confirmaram a ocorrência em Portugal dos genótipos G1 (estirpe ovina) e G7 (estirpe suína).

Todavia, como é óbvio, importará aprofundar a problemática da subespeciação do *E. granulosus* em Portugal, e, face à transumância e ao contrabando de gados que, outrora, ocorria entre os dois países ibéricos,[21,43,44] interessará cotejar os resultados portugueses com os de Espanha – no país vizinho, é reconhecida a existência das estirpes G1 (estirpe ovina), G4 (estirpe equina) e G7 (estirpe suína).[54]

No mapeamento ou zonagem das espécies e estirpes de agentes patogénicos existentes numa dada região ou país, importa:

- evitar abordagens reducionista, optando-se antes por investigações integradas, concatenando elementos epidemiométricos, clínicos, genéticos, ambientais, etc.
- relativamente aos quistos hidáticos que produzem resultados interpretáveis e reprodutíveis, mais do que o *local de abate* dos animais interessa conhecer o *local de criação* dos mesmos. Por exemplo, os quistos hidáticos que recolhemos no antigo matadouro de Vila Franca de Xira respeitavam a ovinos e bovinos criados em propriedades de Santarém. Demais, se já outrora a transumância representou um meio importante de difusão de agentes patogénicos e vectores (ixodídeos, arbovírus, echinococcus, fascíolas, brucelas, babésias, borrélias, leishmânias, rickettsias, ehrlichias, anaplasmas, coxiellas, etc.),[12,21,43,44] o facto é que os modernos circuitos de comercialização e globalização promovem uma ainda maior movimentação de animais para os "quatro quadrantes" do País (basta circular nas estradas portuguesas para verificarmos isso); aliás, historicamente, tal movimentação de gados já acontecia, desde há muito, até mesmo com países estrangeiros: por exemplo, o grande investigador desta problemática, Albert Silbert, registou, desde há séculos, a compra, legalmente organizada, de bovinos à "Barbárie" (Marrocos): "(...) *un détail intéressante [1794]. Il [le* corregedor*] parle des* nombreux troupeaux *que la compagnie (...) 'fait venir de Barbérie', ce qui prouve que le Maroc ne fournissait pas que du blé au Portugal* (...)."[55]

/ Bibliografia

1. Faust EC, Beaver PC, Jung RC. Agentes e Vectores Animais de Doenças Humanas. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

2. David de Morais JA. A Hidatidologia em Portugal: Contribuição para o seu Estudo Integrado. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 1993 (tese de doutoramento).

3. David de Morais JA. The Issue Concerning Diffusion of Echinococcosis/Hydatidosis in Portugal: The Role of Transhumance. Archivos Internacionales de la Hidatidosis 1997; 32: 9-21.

4. David de Morais JA. A Hidatidologia em Portugal (série "Manuais Universitários"). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1998.

5. David de Morais JA. Hidatidose humana. Estudo clínico-epidemiológico no distrito de Évora durante um quarto de século. Acta Med Portuguesa 2007; 20: 1-10. Disponível on-line: www.actamedicaportuguesa.com/arquivo2007.htm

6. David de Morais JA. Ascensão e declínio da hidatidose humana em Portugal. Acta Parasitológica Portuguesa 2009; 16 (1/2): 144-5.

7. David de Morais JA. Progressão e declínio da hidatidose humana em Portugal: análise histórico-epidemiológica. Medicina Interna 2010; 17 (4): 274-85. Errata: Medicina Interna 2011; 18 (1): 58. Disponível on-line: http://www.spmi.pt/revista/vol17/vol17_2010_n4_274_285.pdf

8. Deutz A, Fuchs K, Auer H, Nowotny N. Echinococcosis. An emerging disease in farmers. N Eng J Med 2000; 343 (10): 738-9.

9. Craig P, Pawlowski Z, edit. Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis: an Emergent and Global Problem. Amsterdam: IOS Press (vol. 341 NATO Science Series), 2002.

10. Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. Emerging Infectious Diseases 2006; 12 (2): 296-303.

11. David de Morais JA. Abordagem clínica integrada. Considerações a propósito de um caso de hidatidose múltipla grave. Medicina Interna 2006; 13 (4): 278-88. Disponível em: http://www.spmi.pt/revista/vol13/vol13_n4_2006_278_288.pdf

12. David de Morais JA. Zoonoses emergentes em Portugal: epidemiologia e clínica. Rev Portuguesa Doenç Infec 2009; 5 (3): 95-114.

13. David de Morais. Terapêutica actual da Hidatidose. Rev Portuguesa Doenç Infec 2011; 7 (1): 5-12.

14. Dedola G, Raso AM. Epidemiologia e Profilassi dell'Idatidosi nella Provincia di Nuoro. Nuoro (Sardegna): Edizioni Minerva Medica, 1973.

15. WHO. Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of Echinococcosis/Hydatidosis (VPH/81.28). Geneva: World Health Organization, 1981.

16. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. Lancet 2003; 362: 1295-304.

17. D'Alessandro A. Polycystic echinococcosis in tropical America: Echinococcus vogeli and E. oligarthrus. Acta Tropica 1997; 67: 43-65.

18. Tappe D, Stich A, Frosch M. Emergence of polycystic neotropical echinococcosis. Emerging Infectious Diseases 2008; 14 (2): 292-7.

19. Xiao N, Qiu J, Nakao M et al. Echinococcus shiquicus n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. Int J Parasitol 2005; 35 (6): 693-701.

20. Hegglin D, Ward PI, Deplazes P. Anthelmintic baiting of foxes against urban contamination with Echinococcus multilocularis. Emerging Infectious Diseases 2003: 9 (10): 1266-72.

21. David de Morais JA. A Transumância de Gados Serranos e o Alentejo. Évora: Câmara Municipal de Évora, 1998.

22. Alonso CN, Ferreira JG, Fernández AR et al. Hidatidosis alveolar hepática. Rev Esp Enf Digest 1993; 84 (2): 127-9.

23. Sanai T, Romero L, Aníbal J et al. Hidatidose alveolar hepática. Rev Soc Portuguesa Hidatidologia 2003; 1: 37-40.

24. Thompson RCA, Kumaratilake LM, Eckert J. Observations on Echinococcus granulosus of cattle origin in Switzerland. Intern J Parasitol 1984; 14: 283-91.

25. Thompson RCA, Lymbery AJ. The epidemiological significance of biological variation in Echinococcus. Archivos de la Hidatidosis (XV Extraordinary Congress for Celebration of the 50 Years of A.I.H, Rome) 1991; 30: 195-200.

26. McManus DP, Smyth JD. Differences in the chemical composition and carbohydrate metabolism of Echinococcus granulosus (horse and sheep strains) and E. multilocularis. Parasitology 1978; 77: 103-9.

27. Slepnev NK. Host specificity of Echinococcus granulosus from swine in Belorussia. Trudy (Nauchnye Trudy) Nauchno-Issledovatel'skego Veterinarnogo Instituta Belorusskoi 1975; 13: 113-6.

28. Thompson RCA, Smyth JD. Equine hydatidosis: a review of the current status in Great Britain and the results of an epidemiological survey. Veter Parasitol 1975; 1: 107-27.

29. Pawlowski ZS. Epidemiological basis for chemotherapy of human echinococcosis. Int J Clin Pharmacol Res 1985; 5 (2): 75-8.

30. Thompson RCA, Lymbery AJ. The nature, extent and significance of variation within the genus Echinococcus. Advances Parasitol 1988; 27: 209-59.

31. Le Riche PD, Sewell MMH. Identification of Echinococcus granulosus strains by enzyme electrophoresis. Research Veter Scien 1978; 25: 247-8.

32. Lymbery AJ, Thompson RCA. Electrophoretic analysis of genetic variation in Echinococcus granulosus from domestic hosts in Australia. Intern J Parasitol 1988; 18: 803-11.

33. Lymbery AJ, Thompson RCA. Points in question. Genetic diversity in Echinococcus granulosus – a reply to McManus. Intern J Parasitol 1991; 21: 153-4.

34. Eckert J. Experimental research on echinococcosis: update. Archivos de la Hidatidosis (XV Extraordinary Congress for Celebration of the 50 Years of A.I.H, Rome) 1991; 30: 311-20.

35. Obwaller A, Schneider R, Walochnik J et al. Echinococcus granulosus strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. Parasitology 2004; 128: 569-75.

36. Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski KS, McManus DP. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of Echinococcus granulosus. Parasitology 1997; 114: 37-43.

37. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Laaksonen S et al. Molecular characterization of Echinococcus isolates of cervid origin from Finland and Sweden. Parasitology 2006; 133: 565-70.

38. Eckert J, Thompson RC. Intraspecific variation of Echinococcus granulosus and related species with emphasis on their infectivity to humans. Acta Tropica 1997; 64 (1-2): 19-34.

39. David de Morais JA. Estudo epidemiológico da Equinococose-Hidatidose no distrito de Évora: problemática metodológica. Rev Portuguesa Doenç Infec 1997; 20 (3): 137-45.

40. David de Morais JA. Nosografia do distrito de Évora: estudos prospectivos de campo. Rev Portuguesa Doenç Infec 1997; 20 (1): 5-14.

41. Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F et al. Technique de Génétique par Électrophorèse des Protéines. Paris: Technique et Documentation (Lavoisier), 1987.

42. Mattiucci S, David de Morais JA, Arru E, D'Amelio S, Orecchia P, Paggi L. Genetic homogeneity within Echinococcus granulosus from sheep and cattle of Portuguese and Italian origin. Archivos de la Hidatidosis (Roma) 1991; 30: 875-8.

43. David de Morais JA. A transumância dos gados serranos em Portugal: escorço histórico e epidemiológico. Medicina na Beira Interior da Pré-História ao Século XXI, Cadernos de Cultura (Castelo Branco) 2005; 19: 125-36.

44. David de Morais JA. A Transumância de gados serranos para o Alentejo: abordagem histórica e antropo-ecológica. In: Cultura Pastoril. Livro de Actas do Seminário. Rosmaninhal, Idanha-a-Nova: Centro Cultural Raiano, Câmara Municipal de Idanha-a-Nova, 26 e 27 de Maio de 2007, pp. 11-30: http://www.cm-idanhanova.pt/pdf/publicacoes_online/Actas_seminario_p.pdf [consultado em Janeiro de 2010].

45. Cartucho D, Daniel K, Marrão G et al. Estirpes de Equinococcus granulosus em Portugal: o que sabemos. Beja: I Congresso Ibérico de Hidatidologia e VII Congresso Nacional de Hidatidologia, 9 a 11 de Novembro de 2000 (comunicação).

46. Justo L, Vilares A, Cuesta-Bandera C, Ângelo H. Estudo das estirpes de Echinococcus granulosus no centro e sul de Portugal. Resultados preliminares. Elvas: III Congresso Ibérico de Hidatidologia, Setembro de 2005 (poster).

47. Castro A, Silva A, Veloso G et al. Genotipagem de Echinococcus granulosus por análise das sequências NADH-dehidrogenase 1 e cytocromo C oxidase 1. Acta Parasitológica Portuguesa 2005; 12 (1-2): 395-6.

48. Castro A, Silva E, Freire L, Conceição A, Correia da Costa JM. Equinococose/Hidatidose. Porto: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Centro de Imunologia e Biologia Parasitária, 2007 (relatório policopiado).

49. Beato SFA. Contributo para a caracterização molecular de Echinococcus granulosus em Portugal. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 2008 (dissertação de mestrado).

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

51. David de Morais JA. Chemotherapy of Hydatid disease with Albendazole. First clinical trial carried out in Portugal. Rev Portuguesa Doenç Infec 1992; 15 (2): 95-8.

52. David de Morais JA. Hidatidose esplénica: 20 anos de experiência epidémico-clínica. Rev Portuguesa Doenç Infec 2000; 23: 167-74.

53. David de Morais. Hidatidose abdominal secundária a acidentes traumáticos: a nossa experiência de 20 anos em área endémica. Rev Portuguesa Doenç Infec 2002; 1 (1): 6-15.

54. Mwambete D, Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C. Genetic identification and host range of the Spanish strains of Echinococcus granulosus. Acta Trop 2004; 91: 87-93.

55. Silbert, Albert. Le Portugal Méditerranéen à la fin de l'Ancien Régime, vols I-III. Lisboa: Instituto de Investigação Científica, 1978: 631.