



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

HELMINTOFAUNA GASTROINTESTINAL E HEPÁTICA DO RATINHO-CASEIRO (*Mus musculus domesticus*) DO ARQUIPÉLAGO DA MADEIRA: POTENCIAL ZONÓTICO E IMPORTÂNCIA EM SANIDADE ANIMAL

Ana Sofia Bonito de Figueiredo Valente

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

COORIENTADORA

Doutora Sofia Isabel Vieira Gabriel

2016

LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

HELMINTOFAUNA GASTROINTESTINAL E HEPÁTICA DO RATINHO-CASEIRO (*Mus Musculus domesticus*) DO ARQUIPÉLAGO DA MADEIRA: POTENCIAL ZONÓTICO E IMPORTÂNCIA EM SANIDADE ANIMAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Ana Sofia Bonito de Figueiredo Valente

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

COORIENTADORA

Doutora Sofia Isabel Vieira Gabriel

2016

LISBOA

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, por ter inculcido em mim o fascínio pela Parasitologia desde o segundo ano do curso e durante os estágios de verão onde o gosto por esta área se foi cultivando, por me ter dado a oportunidade de trabalhar neste tema, pelo tempo que prescindiu para responder às minhas dúvidas, pela sua boa disposição constante, pelo apoio em momentos difíceis e sobretudo pela amizade.

À Doutora Sofia Gabriel da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), coorientadora deste trabalho, pela disponibilidade, dedicação, boa disposição, incentivo constante e acima de tudo amizade. Ao Doutor Pedro Martins pela ajuda na análise estatística. Gostaria ainda de agradecer à Professora Doutora Maria da Luz Mathias, pela oportunidade de trabalhar neste tema.

Ao Professor Doutor Jorge Correia pela disponibilidade e ajuda no estudo histopatológico dos fígados e respetivas fotografias, assim como à Mestre Sandra Carvalho, técnica do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), pelo apoio nos cortes histológicos e boa disposição.

À Dra. Lídia Gomes (FMV-UL), pela paciência, incentivo, conhecimentos transmitidos e apoio durante a componente prática do estágio. E ainda pela boa disposição no ambiente de trabalho e amizade desde o segundo ano.

Ao Professor Doutor Robert Rose, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Old Dominion, Virginia, por ser uma fonte de inspiração, pela disponibilidade, interesse e amizade demonstrados ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor Thomas Cribb, da Faculdade de Ciências da Universidade de Queensland, Australia, pela ajuda na identificação de exemplares da Classe Trematoda.

Ao Dr. Telmo Nunes (FMV-UL) por me esclarecer as dúvidas relativas à análise estatística dos resultados.

À Dra. Elisa Luz, Bibliotecária da FMV-UL, pela disponibilidade, simpatia e prontidão em fornecer alguns dos artigos importantes para este trabalho e aos quais não tive acesso.

Ao Mestre Marcos Santos, meu *Anam Cara*, pela paciência nos meus momentos difíceis, dedicação e preciosa ajuda na realização dos maravilhosos mapas e medições dos parasitas, conselhos valiosos quer na vida profissional, quer na vida pessoal, mas sobretudo agradeço-te por todo o amor e amizade. Agradeço também ao Mestre David Ramilo, pela amizade especial desde o início desta aventura, segundo ano do curso, no Laboratório de Parasitologia, pela boa disposição, preciosos conselhos, ajuda na preparação do Lactofenol d'Amann e na análise dos dados. Aos dois, obrigada por todo o apoio e incentivo em ultrapassar todos os momentos mais difíceis, mas também por tornarem exponencial a alegria nos bons momentos.

À Mónica Lagoa e Isabel Arede, pela amizade, apoio e incentivo nos momentos difíceis. Por me ouvirem, por me criticarem construtivamente e por me ajudarem a ser melhor. Para mim a distância não se mede em quilómetros, e vocês estão sempre presentes.

A todos os meus colegas de mestrado e de laboratório, sobretudo à Ana Ferreira e à Sara Bernardino, pelo companheirismo, boa disposição e amizade que me acompanharam durante o estágio.

À minha Mãe, guerreira da minha vida, a pessoa que me fez gostar de aprender, a ser forte e a não desistir, que me educou e me deu a oportunidade de tirar este curso, a ela devo e agradeço tudo e no entanto ela só me pede de volta que seja feliz. À minha Irmã Inês, a minha melhor amiga, pela amizade incondicional e inspiração constante, meu amor como te admiro. Dizem que “o amor não se agradece, retribui-se” mas eu agradeço na mesma, vocês são a minha força. E aos meus Avós, Maria Antónia e Pedro, a vocês também devo o gosto de querer saber e aprender mais, agradeço todo o carinho, dedicação e preocupação.

# **Helmintofauna gastrointestinal e hepática do ratinho-caseiro (*Mus musculus domesticus*) do Arquipélago da Madeira: potencial zoonótico e importância em sanidade animal**

## **Resumo**

Os roedores são reservatórios de diversas espécies parasitas com um importante impacto em saúde humana e animal. O ratinho-caseiro (*Mus musculus domesticus*), devido aos seus hábitos comensais e proximidade a populações humanas, é uma das espécies mais problemáticas no que respeita a disseminação de parasitas zoonóticos. Nas ilhas da Madeira e de Porto Santo, este risco é amplificado pelas elevadas densidades populacionais e pela estreita relação de proximidade com os humanos e produtos agrícolas. Neste estudo, foi analisada pela primeira vez a parasitofauna destas populações insulares de roedores.

Os sistemas digestivos e fígados de 200 ratinhos, 161 da Madeira e 39 de Porto Santo, foram processados para pesquisa de lesões e parasitas, sendo que 182 (91,0%) foram positivos. Na Madeira, 89,4% dos animais foram positivos e em Porto Santo 97,4%.

O tremátode *Brachylaima* sp. foi identificado no intestino delgado de 2,0% da amostra (4/200). O metacéstode *Cysticercus fasciolaris* foi identificado nos fígados de 24,0% dos ratinhos (48/200) e *Cysticercus* sp. em 12,5% (25/200), de ambas as ilhas. O céstode *Hymenolepis diminuta* foi identificado em 0,5% dos indivíduos (1/200) e *Rodentolepis nana* em 2,5% (5/200), ambos apenas identificados no intestino delgado de ratinhos da Madeira. Os nemátodes *Calodium hepaticum*, 23,5% (47/200), espécie zoonótica, *Heligmosomoides polygyrus*, 6,5% (13/200), *Heterakis spumosa*, 5,0% (10/200) e *Trichuris muris*, 39,0% (78/200), foram apenas identificados na ilha da Madeira; *Gongylonema neoplasticum*, 2,0% (4/200) foi apenas identificado na ilha de Porto Santo e *Mastophorus muris*, 11,5% (23/200) e *Syphacia obvelata*, 73,5% (147/200), foram identificados em ambas as ilhas.

Esta variação observada entre ilhas pode ser devida às diferentes densidades populacionais dos ratinhos, *pool* genético, origem dos indivíduos fundadores e/ou diferentes níveis de interação com os hospedeiros definitivos. *C. fasciolaris*, *H. diminuta*, *R. nana* e *C. hepaticum* são agentes zoonóticos cujos ciclos biológicos, de alguns destes, podem envolver carnívoros domésticos com proximidade ao Homem, amplificando o risco de transmissão. *Brachylaima* sp. e *S. obvelata* possuem um potencial zoonótico devido aos seus ciclos biológicos pelo que não devem ser descurados. As infeções humanas por estes parasitas são frequentemente subestimadas, possivelmente devido à falta de conhecimento da importância dos parasitas de roedores como importantes ameaças em termos de saúde pública e animal, sendo um problema digno de estudo no âmbito de *One Health*.

**Palavras-chave:** Arquipélago da Madeira, Roedores, *Mus musculus*, Helminthes, Zoonoses, *One Health*.

# **Gastrointestinal and liver helminthic fauna in house mice (*Mus musculus domesticus*) from the Madeira Archipelago: its zoonotic potential and importance in animal health**

## **Abstract**

Rodents are major reservoirs for parasites with important implications for human and animal health. The western house mouse (*Mus musculus domesticus*), due to its commensal habits and proximity with human dwellings, is one of the most problematic species concerning the spread of zoonotic parasites. In the Portuguese islands of Madeira and Porto Santo, this risk is potentiated by high population densities and a close relationship with humans and agricultural products. In this study, we assessed for the first time the parasitofauna of these rodent insular populations.

The digestive systems and livers of 200 mice, 161 mice from Madeira and 39 from Porto Santo, were screened for lesions and parasites, being 182 (91%) positive. In Madeira island, mice were positive for 89.4% of the samples and in Porto Santo for 97.4%.

The trematode *Brachylaima* sp. was found on both islands in the small intestines of 2.0% of the sample (4/200). The metacestodes *Cysticercus fasciolaris* was found in the livers of 24% mice (48/200) and *Cysticercus* sp. in 12.5% (25/200) on both islands. The adult cestodes *Hymenolepis diminuta* was found in 0.5% of samples (1/200) and *Rodentolepis nana* in 2.5% (5/200), both only found in the small intestines of mice from Madeira.

The nematodes *Calodium hepaticum*, 23.5% (47/200), a zoonotic species, *Heligmosomoides polygyrus*, 6.5% (13/200), *Heterakis spumosa*, 5.0% (10/200) and *Trichuris muris*, 39.0% (78/200), were only detected in Madeira; *Gongylonema neoplasticum*, 2.0% (4/200) was only detected in Porto Santo and *Mastophorus muris*, 11.5% (23/200) and *Syphacia obvelata*, 73.5% (147/200), were detected on both islands.

This variation across islands may be due to differences in mouse population densities, genetic pool, colonization origin and/or different levels of interaction with definitive hosts. *C. fasciolaris*, *H. diminuta*, *R. nana* and *C. hepaticum* are zoonotic agents whose life cycles, for some of them, may involve domestic carnivores in the proximity with humans, amplifying their chance of transmission. *Brachylaima* sp. and *S. obvelata* have also a zoonotic potential due to their life cycles and human proximity, and therefore should not be overlooked. The human infections by these parasites are usually underestimated, possibly due to the lack of knowledge on the importance of rodent parasites as major threats and reason for concern in terms of animal and public health, a problem that should be further studied under the scope of One Health.

**Keywords:** Madeira archipelago, Rodents, *Mus musculus*, Helminths, Zoonosis, One Health.

## Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas .....	xi
Lista de Abreviaturas .....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Atividades no Laboratório .....	1
1.2. Enquadramento e justificação do estudo.....	2
1.3. Caracterização do Arquipélago da Madeira .....	3
1.3.1. <i>Habitats</i> .....	4
1.3.2. Fauna de mamíferos .....	4
1.3.3. Caracterização climática.....	5
1.3.4. Populações humanas, de roedores e Saúde Pública.....	6
1.4. Caracterização do Ratinho-caseiro ( <i>Mus musculus</i> ) .....	8
1.4.1. Morfologia.....	9
1.4.2. Ecologia .....	10
1.4.3. Ciclo de vida.....	10
1.5. Helmintofauna de <i>Mus musculus</i> .....	11
1.5.1. A nível mundial.....	11
1.5.2. A nível ibérico.....	12
1.5.3. A nível insular.....	12
1.6. Objetivos do estudo .....	13
2. Material e Métodos.....	14
2.1. Captura e observação dos hospedeiros.....	14
2.2. Distribuição da amostragem.....	14
2.3. Processamento laboratorial dos hospedeiros.....	16
2.4. Extração dos helmintes.....	16
2.4.1. Preparação dos helmintes .....	17
2.4.2. Classificação das lesões hepáticas por <i>Calodium hepaticum</i> .....	18
2.4.3. Contagem de ovos de <i>Calodium hepaticum</i> .....	18
2.4.4. Técnicas coprológicas .....	19
2.4.5. Técnicas histológicas.....	19
2.5. Identificação dos helmintes .....	19
2.6. Registos e análise dos dados .....	20
2.7. Análise estatística .....	20
2.8. Conceitos adotados no estudo parasitológico .....	21
3. Resultados e Discussão.....	22
3.1. Apresentação dos Resultados .....	22

3.1.1.	Composição qualitativa da Helmintofauna gastrointestinal e hepática de <i>Mus musculus domesticus</i> no Arquipélago da Madeira .....	22
3.1.1.1.	<i>Brachylaima</i> sp. Dujardin, 1845 .....	22
3.1.1.1.1.	Morfologia .....	23
3.1.1.1.2.	Hospedeiros.....	24
3.1.1.1.3.	Distribuição geográfica .....	24
3.1.1.1.4.	Ciclo Biológico .....	25
3.1.1.1.5.	Potencial Zoonótico .....	25
3.1.1.2.	<i>Cysticercus fasciolaris</i> forma larvar de <i>Taenia taeniaeformis</i> (Batsch, 1786) Wolffugel, 1911 .....	25
3.1.1.2.1.	Morfologia.....	25
3.1.1.2.2.	Hospedeiros.....	26
3.1.1.2.3.	Distribuição geográfica .....	27
3.1.1.2.4.	Ciclo Biológico .....	27
3.1.1.2.5.	Potencial Zoonótico .....	27
3.1.1.3.	<i>Cysticercus</i> sp. forma larvar de <i>Taenia</i> sp. ....	28
3.1.1.3.1.	Morfologia.....	28
3.1.1.3.2.	Hospedeiros.....	29
3.1.1.3.3.	Distribuição geográfica .....	29
3.1.1.3.4.	Ciclo Biológico .....	29
3.1.1.4.	<i>Hymenolepis diminuta</i> Rudolphi, 1819.....	29
3.1.1.4.1.	Morfologia.....	29
3.1.1.4.2.	Hospedeiros.....	30
3.1.1.4.3.	Distribuição geográfica .....	31
3.1.1.4.4.	Ciclo Biológico .....	31
3.1.1.4.5.	Potencial Zoonótico .....	31
3.1.1.5.	<i>Rodentolepis nana</i> (von Siebold, 1852) .....	31
3.1.1.5.1.	Morfologia.....	31
3.1.1.5.2.	Hospedeiros.....	32
3.1.1.5.3.	Distribuição geográfica .....	33
3.1.1.5.4.	Ciclo Biológico .....	33
3.1.1.5.5.	Potencial Zoonótico .....	33
3.1.1.6.	<i>Calodium hepaticum</i> (Bancroft, 1893) Moravec, 1982 .....	34
3.1.1.6.1.	Morfologia.....	34
3.1.1.6.1.	Resultados Histopatológicos dos Fígados .....	36
3.1.1.6.2.	Hospedeiros.....	36
3.1.1.6.3.	Distribuição geográfica .....	37
3.1.1.6.4.	Ciclo Biológico .....	37
3.1.1.6.5.	Potencial Zoonótico .....	37
3.1.1.7.	<i>Gongylonema neoplasticum</i> Fibiger et Ditlevsen, 1914.....	38
3.1.1.7.1.	Morfologia.....	38

3.1.1.7.2.	Hospedeiros .....	38
3.1.1.7.3.	Distribuição geográfica .....	39
3.1.1.7.4.	Ciclo Biológico .....	39
3.1.1.7.5.	Potencial Zoonótico .....	39
3.1.1.8.	<i>Heligmosomoides polygyrus</i> Dujardin, 1845 .....	40
3.1.1.8.1.	Morfologia.....	40
3.1.1.8.2.	Hospedeiros .....	41
3.1.1.8.3.	Distribuição geográfica .....	41
3.1.1.8.4.	Ciclo Biológico .....	41
3.1.1.9.	<i>Heterakis spumosa</i> Schneider, 1866 .....	42
3.1.1.9.1.	Morfologia.....	42
3.1.1.9.2.	Hospedeiros .....	43
3.1.1.9.3.	Distribuição geográfica .....	43
3.1.1.9.4.	Ciclo Biológico .....	43
3.1.1.10.	<i>Mastophorus muris</i> Gmelin, 1790 .....	43
3.1.1.10.1.	Morfologia.....	43
3.1.1.10.2.	Hospedeiros .....	44
3.1.1.10.3.	Distribuição geográfica .....	44
3.1.1.10.4.	Ciclo Biológico .....	44
3.1.1.11.	<i>Syphacia obvelata</i> Rudolphi, 1802.....	45
3.1.1.11.1.	Morfologia.....	45
3.1.1.11.2.	Hospedeiros .....	46
3.1.1.11.3.	Distribuição geográfica .....	46
3.1.1.11.4.	Ciclo Biológico .....	46
3.1.1.11.5.	Potencial Zoonótico .....	47
3.1.1.12.	<i>Trichuris muris</i> Schrank, 1788 .....	47
3.1.1.12.1.	Morfologia.....	47
3.1.1.12.2.	Hospedeiros .....	48
3.1.1.12.3.	Distribuição geográfica .....	48
3.1.1.12.4.	Ciclo Biológico .....	48
3.1.2.	Composição quantitativa da Helmintofauna gastrointestinal e hepática de <i>Mus musculus domesticus</i> no Arquipélago da Madeira.....	49
3.1.2.1.	Análise da influência do sexo do hospedeiro .....	52
3.1.2.2.	Análise da influência da idade do hospedeiro .....	58
3.1.2.3.	Caso particular dos hospedeiros infetados por <i>Calodium hepaticum</i> .....	65
3.1.2.4.	Distribuição da infeção por localização geográfica do hospedeiro .....	66
3.2.	Discussão dos Resultados .....	71
3.2.1.	Importância do estudo parasitológico no ratinho-caseiro .....	71
3.2.2.	Composição qualitativa.....	72
3.2.3.	Composição quantitativa .....	74
3.2.3.1.	Influência do sexo do hospedeiro .....	76

3.2.3.2.	Influência da idade do hospedeiro .....	76
3.2.3.3.	Caso particular dos hospedeiros infetados por <i>Calodium hepaticum</i> .....	77
3.2.3.4.	Distribuição da infeção por localização geográfica do hospedeiro .....	78
3.2.4.	Papel do ratinho-caseiro como transmissor de potenciais doenças zoonóticas	78
4.	Conclusões .....	80
5.	Bibliografia .....	82
Anexos.....		94
Anexo A – Resumo da comunicação apresentada sob a forma de painel no 14 <sup>th</sup> <i>Rodens et Spatium</i> International Conference on Rodent Biology, 28 July-2 August 2014, Lisbon, Portugal. ....		95
Anexo B – Resumo da comunicação apresentada sob a forma de painel no 25 <sup>th</sup> International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 16-20 August, Liverpool, UK. ....		97
Anexo C – Preparação do esclarecedor Lactofenol d’Amann.....		99
Anexo D – Técnica de coloração de Tremátodes e Céstodes pelo Carmim Álcool Clorídrico. ....		100
Anexo E – Técnicas Coprológicas. Técnica Flutuação pelo método de Willis, Sedimentação Natural e Esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen. ....		101
Anexo F – Caracterização taxonómica das espécies de helmintes (tremátodes, céstodes e nemátodes).....		102
Anexo G – Esquema dos diferentes tipos de metacéstodes infetantes de céstodes. Adaptado de Dailey (1996).....		104
Anexo H – Esquema da extremidade posterior de um macho de <i>Heterakis spumosa</i> .....		105
Anexo I – Ciclo biológico de <i>Hymenolepis diminuta</i> . Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2013a). ....		106
Anexo J – Ciclo biológico de <i>Rodentolepis nana</i> . Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2013a).....		107
Anexo K – Ciclo biológico de <i>Calodium hepaticum</i> . Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2013b).....		108
Anexo L – Ciclo biológico de <i>Heligmosomoides polygyrus</i> . Adaptado de Dailey (1996). ....		109

## Lista de Figuras

Figura 1 – Região autónoma da Madeira e seus municípios. Adaptado de DREM (2014). ....	3
Figura 2 – Classificação climática do Arquipélago da Madeira.....	5
Figura 3 – Densidade Populacional da ilha da Madeira e da ilha de Porto Santo em 2011. Adaptado de INE (2012). ....	7
Figura 4 - Ilustração científica do ratinho-caseiro <i>Mus musculus domesticus</i> . (Silvar, 2014)..	9
Figura 5 – Mapa da ilha da Madeira e Porto Santo com a distribuição dos pontos de captura dos ratinhos <i>Mus musculus domesticus</i> .....	15
Figura 6 – Ambiente de trabalho (A) e lâmina com montagem de 40 espécimes de <i>Syphacia obvelata</i> em Lactofenol d'Amann (B). ....	17
Figura 7 – Coloração de tremátodes e céstodes pelo Carmim Álcool Clorídrico (A) e técnicas coprológicas (B).....	18
Figura 8 – Medição do comprimento (linha verde) de um exemplar macho de <i>Heligmosomoides polygyrus</i> (A) e composição de fotografias de um exemplar fêmea de <i>H. polygyrus</i> (B) pelo software de imagem Adobe® Illustrator® CS6. ....	20
Figura 9 – Observação em ME (A) e MOC (B, C, D, E) de exemplares adultos de <i>Brachylaima</i> sp.....	23
Figura 10 – Observação em ME (A, B) e MOC (C, D) de <i>Cysticercus fasciolaris</i> , forma larvar de <i>Taenia taeniaeformis</i> . ....	26
Figura 11 – Observação em ME (A) e MOC (B, C, D) de <i>Cysticercus</i> sp., possível forma larvar de <i>Taenia polyacantha</i> .....	28
Figura 12 – Observação em ME (A) e MOC (B, C, D, E) de um espécime de <i>Hymenolepis diminuta</i> .....	30
Figura 13 – Observação em MOC de espécimes de <i>Rodentolepis nana</i> . ....	32
Figura 14 – Observação em MOC de cortes histológicos do fígado de <i>Mus musculus domesticus</i> e do produto de escarificação de um fígado positivo a <i>Calodium hepaticum</i> .....	35
Figura 15 – Observação em ME (A, B) e MOC (C, D, E, F) de espécimes de <i>Gongylonema neoplasticum</i> . ....	38
Figura 16 – Observação em MOC de espécimes de <i>Heligmosomoides polygyrus</i> .....	40
Figura 17 – Observação em MOC de espécimes de <i>Heterakis spumosa</i> .....	42
Figura 18 – Observação a olho nu (A), em ME (B, C, F) e MOC (D, E, G) de espécimes de <i>Mastophorus muris</i> . ....	44
Figura 19 – Observação a olho nu (A) e MOC (B, C, D, E) de espécimes de <i>Syphacia obvelata</i> . ....	45
Figura 20 – Observação ao ME (A, B) e MOC (C, D, E, F) de espécimes de <i>Trichuris muris</i> . ....	47
Figura 21 – Helmintofauna gastrointestinal e hepática presente no Arquipélago da Madeira, ilha da Madeira e ilha de Porto Santo por número de animais positivos.....	49

Figura 22 – Tipos de infeções observadas em <i>Mus musculus domesticus</i> no total de ratinhos positivos no Arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	51
Figura 23 – Distribuição dos ratinhos em função do sexo, peso, idade e tipo de infeção no Arquipélago da Madeira (n=188).....	52
Figura 24 – Distribuição das prevalências parasitárias em função do sexo de <i>Mus musculus domesticus</i> na ilha da Madeira.....	53
Figura 25 – Distribuição das prevalências parasitárias em função do sexo de <i>Mus musculus domesticus</i> na ilha de Porto Santo.....	53
Figura 26 – Distribuição das prevalências parasitárias em função da idade de <i>Mus musculus domesticus</i> na ilha da Madeira.....	62
Figura 27 – Distribuição das prevalências parasitárias em função da idade de <i>Mus musculus domesticus</i> na ilha de Porto Santo.....	62
Figura 28 – Intensidade de infeção nos hospedeiros positivos a <i>Calodium hepaticum</i> . ....	65
Figura 29 – Intensidade de infeção por <i>Calodium hepaticum</i> em função do sexo dos hospedeiros infetados. ....	66
Figura 30 – Intensidade de infeção por <i>Calodium hepaticum</i> em função da faixa etária dos hospedeiros infetados. ....	66
Figura 31 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo de cada indivíduo analisado nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	67
Figura 32 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por <i>Cysticercus fasciolaris</i> e <i>Cysticercus</i> sp. nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.....	68
Figura 33 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por <i>Brachylaima</i> sp. em ambas as ilhas e <i>Hymenolepis diminuta</i> e <i>Rodentolepis nana</i> na ilha da Madeira.....	68
Figura 34 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por <i>Calodium hepaticum</i> na ilha da Madeira. ....	69
Figura 35 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> e <i>Heterakis spumosa</i> na ilha da Madeira. ....	69
Figura 36 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por <i>Gongylonema neoplasticum</i> na ilha de Porto Santo e <i>Mastophorus muris</i> em ambas as ilhas. ....	70
Figura 37 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por <i>Syphacia obvelata</i> nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	70
Figura 38 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por <i>Trichuris muris</i> na ilha da Madeira.....	71

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de <i>Brachylaima</i> spp.....	24
Tabela 2 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários respetivamente de <i>Taenia taeniaeformis</i> (forma adulta) e <i>Cysticercus fasciolaris</i> (forma larvar). .....	27
Tabela 3 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários respetivamente de <i>Taenia polyacantha</i> (forma adulta) e metacéstode (forma larvar). .....	29
Tabela 4 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de <i>Hymenolepis diminuta</i> .	30
Tabela 5 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de <i>Rodentolepis nana</i> . ....	33
Tabela 6 – Espécies de hospedeiros definitivos de <i>Calodium hepaticum</i> .....	36
Tabela 7 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de <i>Gongylonema neoplasticum</i> . .....	39
Tabela 8 – Espécies de hospedeiros definitivos de <i>Heligmosomoides polygyrus</i> .....	41
Tabela 9 – Espécies de hospedeiros definitivos de <i>Heterakis spumosa</i> . .....	43
Tabela 10 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de <i>Mastophorus muris</i> ...	44
Tabela 11 – Espécies de hospedeiros definitivos de <i>Syphacia obvelata</i> . .....	46
Tabela 12 – Espécies de hospedeiros definitivos de <i>Trichuris muris</i> .....	48
Tabela 13 – Helmintofauna gastrointestinal e hepática de <i>Mus musculus domesticus</i> no Arquipélago da Madeira, ilha da Madeira e ilha de Porto Santo com informação da localização no hospedeiro, prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades. ....	50
Tabela 14 – Tipos de infeções observadas em <i>Mus musculus domesticus</i> no total de ratinhos positivos no Arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	51
Tabela 15 – Distribuição dos ratinhos em função do sexo no Arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	52
Tabela 16 – Prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades para exemplares de <i>Mus musculus domesticus</i> do sexo masculino no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	54
Tabela 17 – Prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades para exemplares de <i>Mus musculus domesticus</i> do sexo feminino no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	55
Tabela 18 – Influência do sexo de exemplares de <i>Mus musculus domesticus</i> na prevalência das espécies de parasitas no arquipélago e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	56
Tabela 19 – Influência do sexo de exemplares de <i>Mus musculus domesticus</i> na Intensidade das espécies de parasitas no arquipélago e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	57
Tabela 20 – Distribuição dos ratinhos em função do género e tipo de infeção no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.....	58
Tabela 21 – Distribuição dos ratinhos em função da idade no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	59

Tabela 22 – Prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades para exemplares de <i>Mus musculus domesticus</i> juvenis do arquipélago da Madeira e das ilhas da Madeira e de Porto Santo.....	60
Tabela 23 – Prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades para exemplares de <i>Mus musculus domesticus</i> adultos do arquipélago da Madeira e das ilhas da Madeira e de Porto Santo.....	61
Tabela 24 – Influência da idade dos exemplares de <i>Mus musculus domesticus</i> na prevalência das espécies de parasitas no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo. ....	63
Tabela 25 – Influência da idade dos exemplares de <i>Mus musculus domesticus</i> na Intensidade das espécies de parasitas nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.....	64
Tabela 26 – Distribuição dos ratinhos em função da idade e tipo de infeção no Arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.....	65
Tabela 27 – Compilação das espécies de helmintes identificadas em exemplares de <i>Mus musculus</i> capturados nos Arquipélagos da Madeira, dos Açores, das Canárias e em Portugal continental. ....	73

## Lista de Abreviaturas

A – Arquipélago

a.C. – Antes de Cristo

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AEMET – Agência Estatal de Meteorologia de Espanha

BSh – Clima seco variedade estepe quente

*B.* – *Brachylaima*

*C. (fasciolaris)* – *Cysticercus (fasciolaris)*

*C. (hepaticum)* – *Calodium (hepaticum)*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CESAM – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar

cm – Centímetro

Csa – Clima Temperado com verão seco e quente

Csb – Clima Temperado com verão seco e temperado

Csc – Clima Temperado com verão seco e fresco

DREM – Direção Regional de Estatística da Madeira

*et al.* – *et alii*, e outros

F – Faringe

FCUL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

g – Grama

*G. (neoplasticum)* – *Gongylonema (neoplasticum)*

h – Horas

*H. (diminuta)* – *Hymenolepis (diminuta)*

*H. (polygyrus)* – *Heligmosomoides (polygyrus)*

*H. (spumosa)* – *Heterakis (spumosa)*

hab. – Habitantes

HD – Hospedeiro Definitivo

HI – Hospedeiro Intermediário

IFI – Imunofluorescência Indireta

IM – Instituto de Meteorologia de Portugal

IUCN – *International Union for Conservation of Nature*

km – Quilómetro

km<sup>2</sup> – Quilómetro quadrado

L (1, 2, 3, 4, 5) – Larva (respetivamente no estágio 1, 2, 3, 4, 5)

LC – Pouco Preocupante (*Least Concern*)

m – Metro

m<sup>2</sup> – Metro quadrado

M – Madeira  
*M. (muris)* – *Mastophorus (muris)*  
*M. (musculus)* – *Mus (musculus)*  
ml – Mililitro  
mm – Milímetro  
ME – Microscópio Estereoscópico  
MOC – Microscópio Ótico Composto  
n. sp. – Nova espécie  
OPG - Ovos de Estrongilídeos Gastrointestinais  
PS – Porto Santo  
*R.* – *Rodentolepis*  
*S.* – *Syphacia*  
sp. – Espécie  
spp. – Espécies  
SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*  
*T. (muris)* – *Trichuris (muris)*  
*T. (taeniaeformis)* – *Taenia (taeniaeformis)*  
ULisboa – Universidade de Lisboa  
UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura  
VO – Ventosa oral  
VV – Ventosa ventral  
ZEC – Zonas Especiais de Conservação  
ZPE – Zonas de Proteção Especial  
 $\mu$ l – Microlitro  
 $\mu$ m – Micrómetro  
° – Símbolo de grau  
°C – Graus Celsius

## 1. Introdução

### 1.1. Atividades no Laboratório

O estágio curricular teve lugar no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Durante este estágio curricular foi possível observar e participar em diversas técnicas laboratoriais realizadas rotineiramente no diagnóstico de doenças parasitárias em animais domésticos, silvestres e exóticos, dentro das quais:

- Técnicas coprológicas qualitativas como o método de flutuação ou de Willis e o método de sedimentação natural, e quantitativas como o método de McMaster para contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de estrongilídeos gastrointestinais de ruminantes e equídeos.
- Método de Baermann para pesquisa e identificação de larvas L1 de nemátodes respiratórios em grandes e pequenos animais.
- Coprocultura para observação e identificação de larvas L3 de nemátodes.
- Realização do protocolo de Imunofluorescência Indireta (IFI) para pesquisa de reacção anti-*Leishmania infantum*.
- Pesquisa de ácaros em produto de raspagem cutânea, pêlo e conteúdo auditivo.
- Identificação de exemplares de Helmintes, Artrópodes e Insetos com utilização do Microscópio Estereoscópico (ME) e Microscópio Ótico Composto (MOC).
- Realização de diversas técnicas específicas de coloração: Giemsa para pesquisa de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos, Ziehl-Neelsen para pesquisa de *Cyptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em esfregaços fecais e posterior observação ao MOC.

As actividades no laboratório decorreram entre junho de 2014 e junho de 2015 constituindo um total de 1720 horas práticas.

Dos trabalhos realizados durante o estágio surgiram os seguintes resumos e respetivos posters, um deles com comunicação oral, aceites em conferências internacionais (Anexos A e B):

Valente, A., Gabriel, S.I., Gomes, L., Correia, J., Mathias, M.L. & Madeira de Carvalho, L.M. (2014). Helminthic infections in the liver of *Mus musculus domesticus* from Madeira Archipelago - Preliminary Results [abstract]. *Proceedings of the 14<sup>th</sup> Rodens et Spatium International Conference on Rodent Biology, Lisbon, Portugal, 28 July-2 August 2014*, pp. 152.

Valente, A., Gabriel, S.I., Gomes, L., Correia, J., Mathias, M.L. & Madeira de Carvalho, L.M. (2015). Gastrointestinal and liver helminthic infections in house mice (*Mus musculus domesticus*) from the Madeira Archipelago: implications on Animal and Public Health [abstract]. In *Proceedings of the 25<sup>th</sup> International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Liverpool, UK, 16-20 August*, pp. 352.

## 1.2. Enquadramento e justificação do estudo

O grupo de “Biologia de Adaptação e Processos Ecológicos” do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM - Lisboa) e o Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), no âmbito do Projeto “Especiação ou despeciação? – Zona híbrida entre duas raças cromossómicas do ratinho-caseiro na ilha da Madeira” (PTDC/BIA-EVF/116884/2010), tem vindo a desenvolver um trabalho com exemplares da subespécie *Mus musculus domesticus* capturados em ilhas do Arquipélago da Madeira (nomeadamente Madeira e Porto Santo) com o fim de averiguar a sua origem evolutiva, e do qual resultaram já vários artigos em revistas científicas de referência mundial. Da mesma forma que artefactos materiais podem ser usados como evidências da presença e estilo de vida de humanos em determinada região, também existem os chamados “artefactos vivos”, de denominação habitual *bioproxies*, passíveis de fornecer informação importante mediante a análise do genoma de cada indivíduo. (Jones, Eager, Gabriel, Jóhannesdóttir & Searle, 2013). Estes autores referem várias descobertas inesperadas no seu estudo no que diz respeito à filogeografia do ratinho-caseiro. Um desses achados mais surpreendentes é a ligação deste animal do Arquipélago da Madeira com os Vikings dinamarqueses. Estes verificaram que, apesar da ilha da Madeira ter sido descoberta pelos Portugueses no ano de 1419, determinadas sequências genéticas dos ratinhos analisados apresentavam mais semelhanças com ratinhos do Norte da Europa do que com ratinhos de Portugal Continental (Azevedo, 2013; Jones *et al.* 2013).

Segundo Gabriel, Jóhannesdóttir, Jones, e Searle, (2010) foi possível desenhar prováveis rotas de colonização do ratinho-caseiro *Mus musculus domesticus* baseadas na análise de ADN mitocondrial, sendo que uma das prováveis rotas explicaria a colonização do Arquipélago da Madeira pelo ratinho-caseiro durante a Era Viking, há cerca de 1000 anos. Este povo histórico teria realizado deslocações por via marítima a partir da periferia do noroeste da Europa, permitindo ao ratinho-caseiro a colonização tanto da Escandinávia, como pontos mais a sul da Europa, como o Arquipélago da Madeira (Gabriel *et al.*, 2010).

No decorrer do projeto supracitado foi verificada a presença de um número significativo de agentes parasitários nos fígados e sistemas digestivos dos exemplares capturados, surgindo assim uma possibilidade de colaboração com o laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Criou-se assim uma oportunidade de analisar um grupo significativo de exemplares, tanto da ilha da Madeira como de Porto Santo, a fim de averiguar a helmintofauna gastrointestinal e hepática de *Mus musculus domesticus* do Arquipélago da Madeira, algo não estudado até aos dias de hoje segundo a literatura a que tivemos acesso.

### 1.3. Caracterização do Arquipélago da Madeira

O Arquipélago da Madeira, localizado na margem oriental do Oceano Atlântico Norte, entre o arquipélago dos Açores a Norte e o arquipélago das Canárias a Sul, faz parte de um conjunto de arquipélagos denominado Região Geográfica da Macaronésia, constituída por uma cadeia de ilhas oceânicas vulcânicas moderadamente distantes entre si e do continente africano. Os arquipélagos constituintes, Madeira, Açores, Canárias e Cabo Verde, tiveram a sua origem em eventos geológicos comuns (Capelo *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2008).

O Arquipélago da Madeira, vulgarmente designado de Arquipélago da Madeira e Selvagens, é composto por dois grupos de ilhas: o Grupo Norte que inclui a ilha da Madeira, a ilha de Porto Santo e as ilhas Desertas, e o Grupo Sul localizado mais próximo ao Continente Africano e ao Arquipélago das Canárias, constituído pelas ilhas Selvagens (Figura 1). Apesar da proximidade entre as ilhas do Grupo Norte e as ilhas Selvagens, estudos da morfologia dos fundos oceânicos, verificaram que existe continuidade entre a Madeira e as ilhas Desertas, enquanto a ilha de Porto Santo, a nordeste, encontra-se separada destas por profundidades superiores a 2 000 m (Ribeiro & Ramalho, 2007; Borges *et al.* 2008).

Figura 1 – Região autónoma da Madeira e seus municípios. Adaptado de DREM (2014).



A ilha da Madeira apresenta uma configuração alongada, com cerca de 46 Km este-oeste e 23 Km norte-sul, cobrindo uma área de cerca de 737 Km<sup>2</sup> (Ribeiro & Ramalho, 2007).

A ilha de Porto Santo encontra-se a uma distância de 500 Km de África, 900 Km a sudoeste de Lisboa, e a cerca de 50 Km da ilha da Madeira com a qual contrasta não só em dimensão como também a nível de condições geoclimáticas. Esta ilha, juntamente com os seus ilhéus mais importantes, apresenta uma área de cerca de 43 Km<sup>2</sup>, verificando-se a norte uma vertente mais montanhosa e uma zona de pinhal, já na costa sul a paisagem é dominada, maioritariamente, por cerca de 9 Km de praia (Câmara Municipal de Porto Santo, 2014; DREM, 2014).

### **1.3.1. Habitats**

No arquipélago da Madeira as condições geoclimáticas diferem bastantes entre as ilhas da Madeira e de Porto Santo. A altitude média da ilha da Madeira é de cerca de 646 m sendo o seu pico mais alto o Pico Ruivo, no município de Santana, com cerca de 1 862 m de altura. Já na ilha de Porto Santo, a altitude média é de cerca de 86 m, e onde o pico mais alto é o Pico de Facho com cerca de 517 m de altura (França & Almeida, 2003; Cabrita, 2004).

Na Madeira os solos predominantes são de coloração escura e de origem vulcânica, que se encontram geralmente em ambiente montanhoso e húmido, de regiões árticas a tropicais com uma grande diversidade de vegetação. Em Porto Santo os solos predominantes são de origem calcária encontrando-se geralmente em locais planos ou com colinas, em ambientes áridos e semiáridos, e cuja vegetação natural é escassa, sendo dominada por arbustos e árvores xerófitas (França & Almeida, 2003; IUSS Grupo de Trabajo WRB, 2007).

A Conservação da Natureza tem sido alvo de diversos esforços por parte de instituições e organizações, pelo que é elevada a área de zonas protegidas na Região Autónoma da Madeira. Em 1982, foi criado o Parque Natural da Madeira que abrange cerca de 2/3 do território da ilha da Madeira, e diversas zonas constituem Reservas Naturais e Áreas Protegidas (França & Almeida, 2003; Serviço do Parque Natural da Madeira, 2014). A floresta Laurissilva foi considerada em 1999, Património Mundial pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO). Esta formação florestal, cuja origem remonta ao Terciário, apresenta uma grande diversidade biológica, de fauna e flora, sendo exclusiva dos arquipélagos da Madeira, Açores e Canárias (França & Almeida, 2003; Comissão Nacional da UNESCO, n.d.; Fontinha, 2004; Menezes *et al.*, 2006; Serviço do Parque Natural da Madeira, 2015).

A ilha da Madeira está coberta em mais de metade por superfície florestal, constituindo os espaços naturais, cerca de um quarto do seu território. A área agrícola nesta ilha é na ordem dos 18% enquanto a área social ocupa apenas cerca de 5% da ilha, localizando-se a sua maioria na vertente sul da ilha. Relativamente à ilha de Porto Santo, a rocha mãe aflora à superfície em quase toda a ilha, predominando a aridez com apenas um pequeno bosque numa das zonas de maior altitude. A ocupação agrícola representa cerca de 10% da área total, e a floresta exótica aproximadamente 15% (França & Almeida, 2003; Cabrita, 2004).

### **1.3.2. Fauna de mamíferos**

O arquipélago da Madeira ao possuir estas características únicas permitiu o desenvolvimento de uma grande diversidade biológica. No que diz respeito à fauna de mamíferos, esta é maioritariamente constituída por mamíferos terrestres introduzidos pelo Homem, à exceção do morcego, único mamífero terrestre autóctone. Destes mamíferos terrestres, as espécies carnívoras são constituídas maioritariamente por duas espécies assilvestradas, *Felis catus* (gato) e *Mustela furo* (furão). Dos restantes, alguns foram voluntariamente introduzidos como

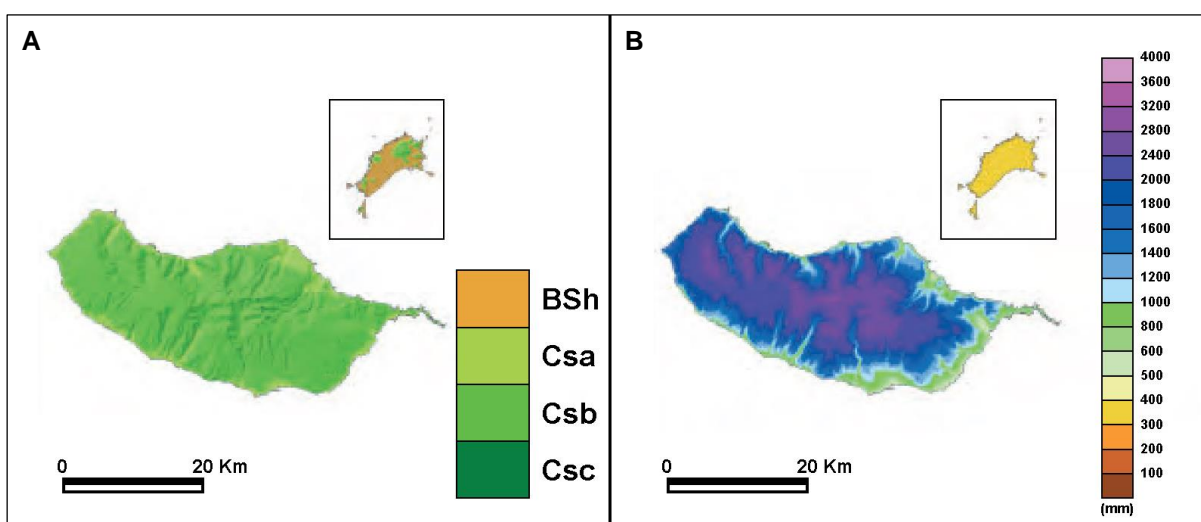
o caso do *Oryctolagus cuniculus* (coelho-bravo) e outros involuntariamente como *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* (ratinhos e ratazanas) (Jesus, Teixeira, Teixeira, Freitas & Russo, 2009). Estas espécies roedoras podem estar infetadas com uma grande variedade de parasitas e agentes zoonóticos adquirindo o estatuto de praga com forte impacto em Saúde Pública (Battersby, Hirschhorn & Amman, 2008).

### 1.3.3. Caracterização climática

A biodiversidade que se verifica no arquipélago da Maderia, tanto de fauna como de flora, encontra-se estabelecida dadas as condições de orografia e geoclimáticas características destes territórios insulares.

A ilha da Madeira, segundo a classificação climática de Köppen, apresenta predominantemente um clima temperado com verão seco e temperado (clima do tipo Csb com temperatura média do mês mais quente com valor menor ou igual a 22°C e com quatro ou mais meses com temperaturas médias superiores a 10°C) (Figura 2A). Por outro lado, as zonas costeiras apresentam um clima temperado com verão seco e quente (clima do tipo Csa com temperatura média do mês mais quente com valor superior a 22°C) (Agência Estatal de Meteorologia de Espanha [AEMET] e Instituto de Meteorologia de Portugal [IM], 2011) (Figura 2A). A ilha de Porto Santo apresenta um clima seco do tipo estepe quente (clima do tipo BSh com uma temperatura média anual superior a 18°C). Contudo, nas áreas de maior altitude assemelha-se à ilha da Madeira apresentando um clima temperado com verão seco e temperado (Csb) (AEMET & IM, 2011) (Figura 2A).

Figura 2 – Classificação climática do Arquipélago da Madeira.



A - Classificação climática de Köppen-Geiger. BSh (Clima Seco variedade estepe quente), Csa (Clima Temperado com verão seco e quente), Csb (Clima Temperado com verão seco e temperado), Csc (Clima Temperado com verão seco e fresco). Na ilha da Madeira observam-se os climas do tipo Csa, Csb e Csc. Na ilha de Porto Santo observam-se os climas do tipo BSh, Csa e Csb. B - Média da precipitação total anual no arquipélago da Madeira (1971-2000). Adaptado de AEMET & IM (2011).

Os valores médios anuais da temperatura média do ar no Arquipélago da Madeira dependem da altitude do local e diminuem com o aumento desta, variando entre 14°C e 18°C nas regiões costeiras e entre 6°C e 12°C nas regiões interiores de maior altitude. Os valores médios anuais da temperatura máxima são superiores a 20°C nas regiões costeiras da ilha da Madeira e em quase toda a ilha de Porto Santo, sendo mesmo superiores a 22°C na faixa litoral Sul e Noroeste da ilha da Madeira. Os valores médios anuais da temperatura mínima do ar variam num intervalo entre 4°C e 8°C nas áreas de maior altitude apresentando valores superiores a 12°C nas áreas costeiras (AEMET & IM, 2011).

A precipitação média anual varia entre ilhas, sendo mais abundante na ilha da Madeira (Funchal – 596,4 mm) que na ilha de Porto Santo (Aeroporto – 361,3 mm) (Figura 2B). Na ilha da Madeira, a precipitação média anual é fortemente influenciada pela orografia e pelas vertentes a norte e a sul, sendo a precipitação mais abundante em cotas mais altas da ilha e nas vertentes situadas mais a norte (AEMET & IM, 2011). Já na ilha de Porto Santo, a orografia suave, ao contrário do que se verifica na ilha da Madeira, deixa passar os ventos alísios predominantes impedindo o processo de condensação, conferindo a esta ilha um clima mais seco e um ambiente mais árido (Faria *et al.*, 2008). A precipitação no Arquipélago da Madeira é então, mais abundante nos meses de dezembro e de janeiro. Já o período seco em alguns pontos da ilha da Madeira é muito curto, resumindo-se apenas ao mês de julho (AEMET & IM, 2011) (Figura 2B).

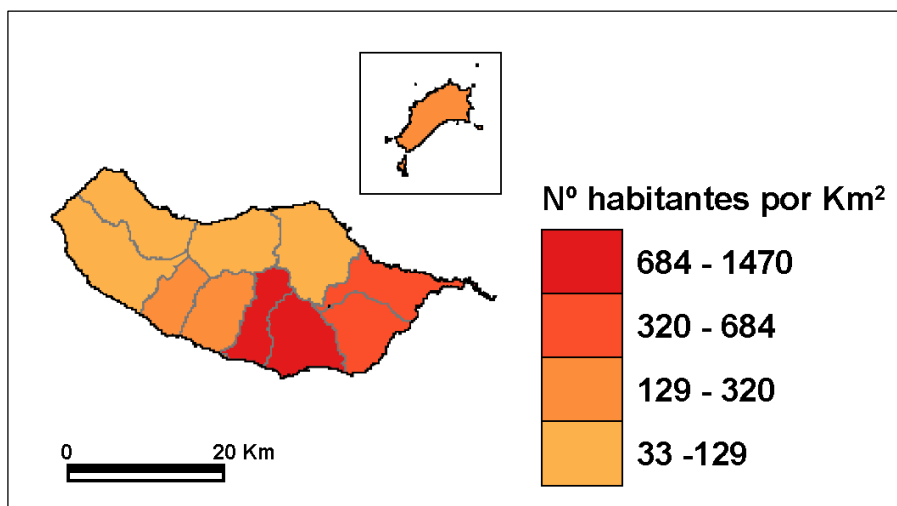
Alterações na temperatura e flutuações da precipitação têm efeitos a curto e a longo prazo no *habitat* tanto de espécies vectoras como de helmintes. Níveis elevados de precipitação potenciam o aumento de locais de reprodução de alguns vetores como mosquitos, carraças e caracóis (Githeko, Lindsay, Confalonieri & Patz, 2000). Na realidade, o clima do arquipélago da Madeira, particularmente a ilha da Madeira, com temperaturas médias amenas e humidade elevada ao longo de todo o ano, concorre em grande medida para facilitar os ciclos biológicos de diversos parasitas nomeadamente helmintes (Mas-Coma, Valero & Bargues, 2008; Froeschke & Matthee, 2014).

#### **1.3.4. Populações humanas, de roedores e Saúde Pública**

Segundo a estimativa do ano de 2013 da Direção Regional de Estatística da Madeira [DREM] (2014), a Região Autónoma da Madeira apresentava uma densidade populacional de 326,2 hab./Km<sup>2</sup>, sendo que Porto Santo apresentava uma densidade populacional de 124,4 hab./Km<sup>2</sup>. Assim, na ilha da Madeira a população residente era de cerca de 256 014 habitantes, já na ilha de Porto Santo verificou-se uma ocupação de cerca de 5 299 habitantes. Segundo dados dos Censos de 2011, a densidade populacional na Região Autónoma da Madeira era cerca de três vezes superior à média de Portugal continental (114,5 hab/Km<sup>2</sup>), situação que se verificou igualmente no ano de 2013 (Instituto Nacional de Estatística [INE], 2012; DREM (2014) (Figura 3).

Os roedores em geral, estão presentes tanto em *habitats* naturais como em ambientes urbanos em proximidade com populações humanas, sendo que nestes últimos encontram condições propícias à sua subsistência devido a maior quantidade de alimento, água e abrigos, assim como a ausência de predadores naturais. Estas condições levam ao estabelecimento de colónias de roedores com maiores densidades populacionais que as observadas nas populações selvagens (Mathias, 1999; Froeschke & Matthee, 2014).

Figura 3 – Densidade Populacional da ilha da Madeira e da ilha de Porto Santo em 2011. Adaptado de INE (2012).



As espécies de roedores representam cerca de 40% das espécies de mamíferos e têm vindo a ser mencionadas como sendo um dos maiores reservatórios de zoonoses, com impacto significativo em Saúde Pública, Animal e Ambiental – *One Health* (Singleton & Krebs, 2007; Bidaisee & Macpherson, 2014; Froeschke & Matthee, 2014).

Meerburg, Singleton & Kijlstra (2009), descrevem no seu artigo de revisão, 61 agentes patogénicos em roedores passíveis de serem transmitidos a humanos, e dessa forma zoonóticos, bem como as suas consequências em termos de morbilidade e mortalidade, tanto a nível animal como humano. Destes 61 agentes, 20 são de natureza viral, 19 de natureza bacteriana e 22 de natureza parasitária. Estes agentes patogénicos podem ser transmitidos por duas vias: direta ou indireta. A via direta pode ocorrer através de mordedura, ingestão de alimentos e água contaminados com excrementos dos roedores, ou ainda por via cutânea a partir de água contaminada com urina ou por inalação de agentes presentes nos excrementos. A Síndrome Pulmonar por Hantavírus, a Leptospirose, a Febre de Lassa, a Peste Negra e a Salmonelose são alguns exemplos de doenças transmitidas por esta via (Meerburg *et al.*, 2009; *Centers for Disease Control and Prevention*, 2011). A via indireta pode ocorrer através do contacto com ectoparasitas artrópodes vetores (como carraças, ácaros e pulgas) ou através da ingestão de alimentos de origem animal de indivíduos que ingeriram roedores infetados e/ou os seus excrementos. A Babesiose, a Leishmaniose Cutânea, a Peste Negra

e a Doença de Lyme são exemplos de doenças que podem ser transmitidas através de via indireta (Meerburg *et al.*, 2009; Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

Variações na ocupação humana do território, juntamente com alterações climáticas mundiais, podem levar ao aparecimento e/ou aumento de doenças transmitidas por roedores, uma vez que os vetores, hospedeiros intermediários e definitivos, e os próprios roedores, podem ser influenciados por estas variações (Githeko *et al.*, 2000).

O ratinho-caseiro (*Mus musculus*) é provavelmente o mamífero mais invasivo e ubiqüitário, e com maior sucesso depois do Homem, sendo por isso considerado como um dos 100 invasores da lista *100 of the World's Worst Invasive Alien Species* publicada pela *Global Invasive Species Database*. (Lowe, Browne, Boudjelas & De Poorter, 2000; Cucchi, Auffray & Vigne, 2012).

#### **1.4. Caracterização do Ratinho-caseiro (*Mus musculus*)**

O ratinho-caseiro, de nome científico *Mus musculus*, pertence ao Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Mammalia, Ordem Rodentia, Família Muridae, Género *Mus* e epíteto específico *musculus* Linnaeus, 1758. Inicialmente considerava-se a existência de duas espécies distintas, *Mus musculus* Linnaeus, 1758 e *Mus domesticus* Schwartz & Schwartz, 1943, no entanto evidências mais recentes indicam que *Mus domesticus* poderá ser na realidade uma subespécie de *Mus musculus*, dando origem à denominação de *Mus musculus domesticus* (Sans, 2002; Singleton & Krebs, 2007; Musser *et al.*, 2008; Jong *et al.*, 2014).

As evidências da presença de *Mus musculus domesticus* datam de 12000 a.C., ainda que o seu crescimento exponencial se tenha verificado apenas 2000 anos depois, durante o período Neolítico no Antigo Oriente (atual Médio Oriente). Este fenómeno surgiu na transição da estratégia de subsistência dos caçadores-recolectores para a produção de alimentos de forma sedentária, com o desenvolvimento da agricultura e subsequente armazenamento dos cereais (Cucchi *et al.*, 2012).

Este roedor é classificado, segundo a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), como Pouco Preocupante (LC), com uma distribuição essencialmente em *habitats* antropogénicos, e cujo contacto com o homem tem permitido a sua disseminação pelo planeta, com excepção da Antártica (Musser *et al.*, 2008). No caso de Portugal o ratinho-caseiro encontra-se vastamente distribuído por todo o território continental bem como nos arquipélagos dos Açores e da Madeira. Neste último, o ratinho-caseiro, *Mus musculus*, encontra-se presente nas ilhas da Madeira, Porto Santo e Desertas (Borges *et al.*, 2008), tendo sido erradicado da ilha Selvagem Grande após um projecto de erradicação de espécies invasoras iniciado em 2002 (Oliveira *et al.*, 2010). Contrariamente às populações continentais, nas ilhas do arquipélago o ratinho-caseiro ocupa igualmente *habitats* exteriores, não estritamente dependentes da presença humana. Isto acontece principalmente devido à inexistência da maioria das espécies de roedores encontrada no continente (por exemplo,

*Mus spretus* ou *Apodemus sylvaticus*), reduzindo a competição inter-específica. Apesar disto as populações comensais possuem densidades mais elevadas do que as populações selvagens (Mathias, 1999). Estas populações comensais associadas à presença humana encontram nestes locais maior disponibilidade de alimento e abrigo (Mathias, 1999), ocupando um certo número de construções urbanas desde casas e celeiros, a fábricas e locais de armazenamento de alimentos com atmosfera controlada (MacDonald & Barrett, 1993; Battersby *et al.*, 2008). Relativamente às populações selvagens estas tendem a ocupar áreas litorais arenosas, zonas florestais e de preferência próximas de cursos de água, contudo ocupam igualmente áreas de cultivo com sistema de regadio e jardins (MacDonald & Barrett, 1993; Mathias, 1999; Battersby *et al.*, 2008). A ausência da maior parte dos predadores naturais nas ilhas também contribui para a expansão das áreas ocupadas pelo ratinho-caseiro.

#### 1.4.1. Morfologia

O ratinho-caseiro, *Mus musculus*, apresenta olhos pretos brilhantes e proeminentes, orelhas redondas e um focinho pontiagudo com longos bigodes (MacKay *et al.*, 2010). A pelagem deste roedor apresenta uma coloração que pode variar entre o castanho claro, o cinzento e o preto, no entanto a pelagem na região ventral apresenta uma coloração mais clara podendo variar entre o branco, o creme, o castanho e o cinzento (Berry, 1970; Hutchins, 2003; Battersby *et al.*, 2008; MacKay *et al.*, 2010) (Figura 4).

Figura 4 - Ilustração científica do ratinho-caseiro *Mus musculus domesticus*. (Silvar, 2014).



A sua cauda, cujo comprimento (6,0-10,5 cm) é aproximadamente igual ao da soma do comprimento da cabeça e do corpo (6,5-9,5 cm), apresenta-se espessa, escamosa, com anéis proeminentes e praticamente sem pêlo (MacDonald & Barrett, 1993; Battersby *et al.*, 2008). O ratinho-caseiro pode medir entre 13-20 cm de comprimento total e pesar entre 12-30 g (MacDonald & Barrett, 1993; Battersby *et al.*, 2008; MacKay *et al.*, 2010). De um modo geral, as fêmeas de ratinhos capturados em meio selvagem são ligeiramente maiores que os

machos, ao contrário do que se verifica nos ratinhos em cativeiro (Berry, 1970; MacDonald & Barrett, 1993).

O isolamento geográfico que se verifica em populações de roedores residentes em ilhas faz com que apresentem diferenças frequentes na sua demografia, reprodução, comportamento e morfologia quando comparadas com populações de roedores do continente. Estas diferenças integram o conceito de *Síndrome Insular* caracterizado por densidades mais elevadas e estáveis, melhor capacidade de sobrevivência e aumento da massa corporal, assim como diminuições ao nível da agressividade, taxa reprodutiva e dispersão (Adler & Levins, 1994).

#### **1.4.2. Ecologia**

Os indivíduos desta espécie são animais tipicamente noturnos ou crepusculares, podendo estar ativos durante o dia, caso haja escassez de alimento. São mamíferos extremamente ágeis, com um excelente sentido de equilíbrio, o que lhes permite saltar e nadar razoavelmente bem. Ratinhos jovens conseguem passar por brechas de largura inferior a 7-8 mm, enquanto ratinhos adultos conseguem somente passar por brechas com tamanho superior a 1 cm de largura. As suas tocas têm geralmente cerca de 2 cm de diâmetro (Battersby *et al.*, 2008; Olsen, 2013). A audição e o olfato estão bem desenvolvidos, sendo a comunicação entre eles e o reconhecimento do ambiente feitos principalmente pelo olfato (MacDonald & Barrett, 1993). A alimentação destes animais varia significativamente consoante o *habitat* dos mesmos (Battersby *et al.*, 2008). O ratinho-caseiro é predominantemente granívoro e portanto em ambientes cultivados as sementes são a base da sua dieta. Em ambientes não cultivados a alimentação é à base de sementes, plantas (folhas, raízes e caules), frutos, fungos, insetos (nomeadamente no estado larvar) e outros invertebrados, ovos, penas e até mesmo outros vertebrados (Bomford, 1987; Wanless, Angel, Cuthbert, Hilton & Ryan, 2007).

Os dejetos do ratinho-caseiro têm geralmente a forma de bastonete, com cerca de 6 mm de comprimento e 2-2,5 mm de largura, apresentando um odor rançoso e sendo bastante duros quando secos, não se desfazendo com facilidade ao contrário do que acontece com os dejetos de outros pequenos mamíferos, como por exemplo os morcegos (Howie, 2007; Olsen, 2013). Atualmente, a densidade populacional deste roedor pode variar de 10 ratinhos por m<sup>2</sup>, no caso de populações comensais, a 1 ratinho por 100 m<sup>2</sup>, no caso de populações selvagens. Em condições ideais as populações podem ter crescimentos bastante significativos atingindo densidades populacionais na ordem dos 200 000 ratinhos por hectare (MacKay *et al.*, 2010).

#### **1.4.3. Ciclo de vida**

As fêmeas de *Mus musculus* tornam-se sexualmente maduras por volta das 6 semanas de vida, embora tal possa ocorrer mais tarde perante elevada densidade populacional e

temperatura baixa. Por sua vez, os machos atingem a maturidade sexual mais tardiamente que as fêmeas, contudo são menos afetados pelas alterações ambientais. A gestação tem a duração de 19-21 dias culminando no parto que geralmente ocorre de noite. A fêmea entra novamente em ovulação cerca de 12-18 horas pós-parto (Berry, 1970; Mathias, 1999). As ninhadas podem ser de 3 a 12 crias ocorrendo entre 5 a 10 vezes por ano (Hutchins, 2003). As crias pesam cerca de 1 g à nascença, apresentando-se cegas, surdas, sem pelo e totalmente dependentes da progenitora. A taxa de crescimento pós-natal depende da quantidade de leite disponível, e este por sua vez depende do tamanho da ninhada. Os ratinhos são desmamados por volta das 3 semanas de vida pesando geralmente 10 g (Berry, 1970; Mathias, 1999). Os ratinhos em meio selvagem vivem em média cerca de 1 ano, enquanto os ratinhos em cativeiro vivem geralmente cerca de 2 anos (Hutchins, 2003).

### **1.5. Helmintofauna de *Mus musculus***

Os roedores desempenham o papel de hospedeiros definitivos e hospedeiros intermediários dos ciclos biológicos de diversos parasitas. Para além destas características podem ainda desempenhar o papel de hospedeiros paraténicos, albergando parasitas de forma temporária sem desenvolvimento dos mesmos, podendo facilitar a sua disseminação e manutenção do seu ciclo biológico (Gosling, 2005; Zajac & Conboy, 2012).

#### **1.5.1. A nível mundial**

Singleton & Krebs (2007) descrevem na sua obra uma compilação de diversos endoparasitas e ectoparasitas identificados em populações selvagens de ratinho-caseiro, e cujos autores consideram tratar-se de duas espécies distintas *Mus musculus* e *Mus domesticus*. A helmintofauna presente nestas populações selvagens de ratinho-caseiro é constituída por pelo menos 5 espécies de tremátodes (*Brachylaima* sp., *Brachylaima cribbi*, *Echinostoma indoense*, *Fasciola hepatica* e *Zonorchis* sp.), 9 espécies de céstodes [*Catenotaenia pusilla*, *Echinococcus multilocularis*, *Hymenolepis diminuta* (= *Rodentolepis/Vampirolepis diminuta*), *Mesocestoides* sp., *Paranoplocephala* sp., *Raillietina* sp., *Rodentolepis nana* (= *Vampirolepis/Hymenolepis fraterna*; *Rodentolepis fraterna*) e *Rodentolepis microstoma* (= *Vampirolepis/Hymenolepis straminea*), *Taenia taeniaeformis* (= *Cysticercus fasciolaris*)] e 21 espécies de nemátodes [*Aonchotheca annulosa* (= *Capillaria annulosa*), *Aspicularis tetraptera*, *Calodium hepaticum* (= *Capillaria hepatica*), *Eucoleus bacillatus* (= *Capillaria bacillatus*), *Gallegostongylus australis*, *Gallegostongylus ibicensis*, *Gongylonema aegypti*, *Gongylonema musculi*, *Gongylonema neoplasticum*, *Heligmosomoides polygyrus* (= *Nematospiroides dubius*), *Heterakis spumosa* (= *Ganguleterakis*), *Mastophorus muris*, *Muspicea borreli*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Physaloptera getula*, *Protospirura muris* (= *Mastophorus*), *Syphacia obvelata*, *Syphacia stoma*, *Trichinella spiralis*, *Trichosomoides crassicauda* e *Trichuris muris*].

### 1.5.2. A nível ibérico

Ao nível da Península Ibérica está descrita a presença de pelo menos 2 espécies de tremátodes (*Brachylaemus erinacei*, *Brachylaemus recurvus*), 5 espécies de céstodes [*Catenotaenia pusilla*, *Hymenolepis diminuta*, *Mesocestoides lineatus*, *Rodentolepis nana* (= *Rodentolepis fraterna*), *Taenia taeniaeformis* (larva)] e 8 espécies de nemátodes (*Aspicularis tetraptera*, *Calodium hepaticum*, *Gongyлонema musculi*, *Gongyлонema neoplasticum*, *Heterakis spumosa*, *Syphacia obvelata*, *Trichinella spiralis* e *Trichuris muris*) (Campillo et al., 1980).

Em Portugal foram já realizados estudos pontuais sobre helmintofauna no ratinho-caseiro nomeadamente, no Jardim Zoológico de Lisboa (Crespo, 2012) e no Alentejo (Catanho et al., 2003), que no seu conjunto incluem 3 espécies de céstodes (*Cysticercus fasciolaris*, *Hymenolepis diminuta* e *Hymenolepis nana*) e 7 espécies de nemátodes (*Aspicularis tetraptera*, *Calodium hepaticum*, *Heterakis spumosa*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Syphacia* sp., *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*). Foi ainda realizado um estudo em *Rattus norvegicus* na zona da grande Lisboa tendo sido identificadas 1 espécie de tremátodes (*Brachylaima recurva*), 3 espécies de céstodes [*Cysticercus fasciolaris*, *Hymenolepis diminuta* e *Vampirolepis nana* (= *Rodentolepis nana*)] e 6 espécies de nemátodes [*Capillaria hepatica* (= *Calodium hepaticum*), *Gongyлонema neoplasticum*, *Heterakis spumosa*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichosomoides crassicauda* e *Trichostrongylus* sp.] (Afonso-Roque, Mendonça, Marcos & Lopes, 1984).

### 1.5.3. A nível insular

Nas ilhas Baleares, arquipélago pertencente a Espanha e situado no Mar Mediterrâneo, foram identificadas pelo menos 2 espécies de tremátodes (*Brachylaima ruminiae* e *Brachylaima* sp.), 4 espécies de céstodes [*Catenotaenia pusilla*, *Hydatigera taeniaeformis* (syn. *Taenia taeniaeformis*), *Hymenolepis* sp. (possivelmente *Rodentolepis microstoma*) e *Mesocestoides* sp. (larva)] e 6 espécies de nemátodes (*Aspicularis tetraptera*, *Gongyлонema* sp., *Physaloptera getula*, *Spiruroidea* gen. sp. larva, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*) (Mas-Coma et al., 1998).

Ao nível do Arquipélago dos Açores foram realizados diversos estudos sobre a helmintofauna em *Mus musculus*, como são exemplo estudos feitos em São Miguel (Pereira, 2009) e em São Miguel, Terceira e Flores (Casanova et al., 1996), que no seu conjunto incluem 2 tremátodes (*Brachylaima* sp. e *Skrjabinocoelus* sp.), 5 espécies de céstodes [*Cladotaenia globifera* (larva), *Cysticercus fasciolaris*, *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis straminea* e *Rodentolepis nana*], 10 espécies de nemátodes (*Aonchotheca annulosa*, *Calodium hepaticum*, *Eucoleus gastricus*, *Gongyлонema neoplasticum*, *Heterakis spumosa*, *Mastophorus muris*, *Nematoda* sp., *Nippostrongylus brasiliensis*, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*) e 1 espécie Acanthocephala (*Prosthorhynchus* sp.).

Outro estudo a referir será a tese de doutoramento de Afonso-Roque (1989) que para além de vários mamíferos e roedores, contemplou também a análise de 5 exemplares de *Mus musculus*, tendo sido identificados 1 céstode (*Cysticercus pisiformis*) e 2 nemátodes (*Calodium hepaticum* e *Syphacia obvelata*).

Também ao nível do Arquipélago das Canárias foram já realizados diversos estudos (López-Darias, Ribas & Feliú, 2008) sobre a helmintofauna em roedores, sendo de destacar o trabalho realizado por Feliu *et al.* (2012) em *Mus musculus domesticus* na ilha El Hierro, no qual foram identificadas 2 espécies de céstodes [*Rodentolepis microstoma* e *Taenia taeniaeformis* (larva)], 6 espécies de nemátodes [*Mastophorus muris*, *Protospirura* sp., *Rictularia* sp., *Heterakis spumosa*, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*] e 1 espécie Acanthocephala (*Prosthorhynchus cylindraceus* (larva)).

No caso específico do Arquipélago da Madeira não existe, até à data, qualquer registo bibliográfico da helmintofauna de *Mus musculus*. Como Borges *et al.* (2008) referem no seu estudo “o nosso conhecimento da diversidade nematológica do arquipélago [da Madeira] está longe de ser completo” sendo que das várias espécies de nemátodes descritas nesta obra, nenhuma foi identificada em *Mus musculus*.

#### **1.6. Objetivos do estudo**

O ratinho-caseiro, *Mus musculus domesticus*, é um roedor comensal, cuja localização é essencialmente próxima de populações humanas, sendo passível de transmitir doenças ao Homem, animais domésticos e espécies selvagens, constituindo uma potencial ameaça à Saúde Pública.

No âmbito desta temática, o presente trabalho teve como principais objetivos:

- a) O estudo da helmintofauna gastrointestinal e hepática presente em exemplares capturados no arquipélago da Madeira (ilhas da Madeira e de Porto Santo);
- b) Identificação e quantificação das espécies presentes, assim como a análise destas em função de fatores como o sexo, idade e localização geográfica dos ratinhos;
- c) Avaliação do seu potencial zoonótico e relevância em Saúde Pública e Uma Saúde.

## **2. Material e Métodos**

O material biológico alvo de estudo, gentilmente cedido pelo grupo de “Biologia de Adaptação e Processos Ecológicos” do CESAM - Lisboa e Departamento de Biologia Animal da FCUL no âmbito do Projeto “Especiação ou despeciação? – Zona híbrida entre duas raças cromossómicas do ratinho-caseiro na ilha da Madeira”, foi constituído por 161 fígados e sistemas digestivos de 161 hospedeiros capturados na ilha da Madeira, e 39 fígados e sistemas digestivos de 39 hospedeiros capturados na ilha de Porto Santo perfazendo um total de 200 ratinhos *Mus musculus domesticus* analisados (Figura 5).

### **2.1. Captura e observação dos hospedeiros**

Os espécimes de *Mus musculus domesticus* foram capturados nos meses de setembro de 2012, maio, junho, setembro, outubro, novembro e dezembro de 2013 e outubro de 2014. Para o efeito foram utilizadas armadilhas *Sherman* usando como isco uma mistura de sardinha em lata e farinha, sendo os animais capturados vivos.

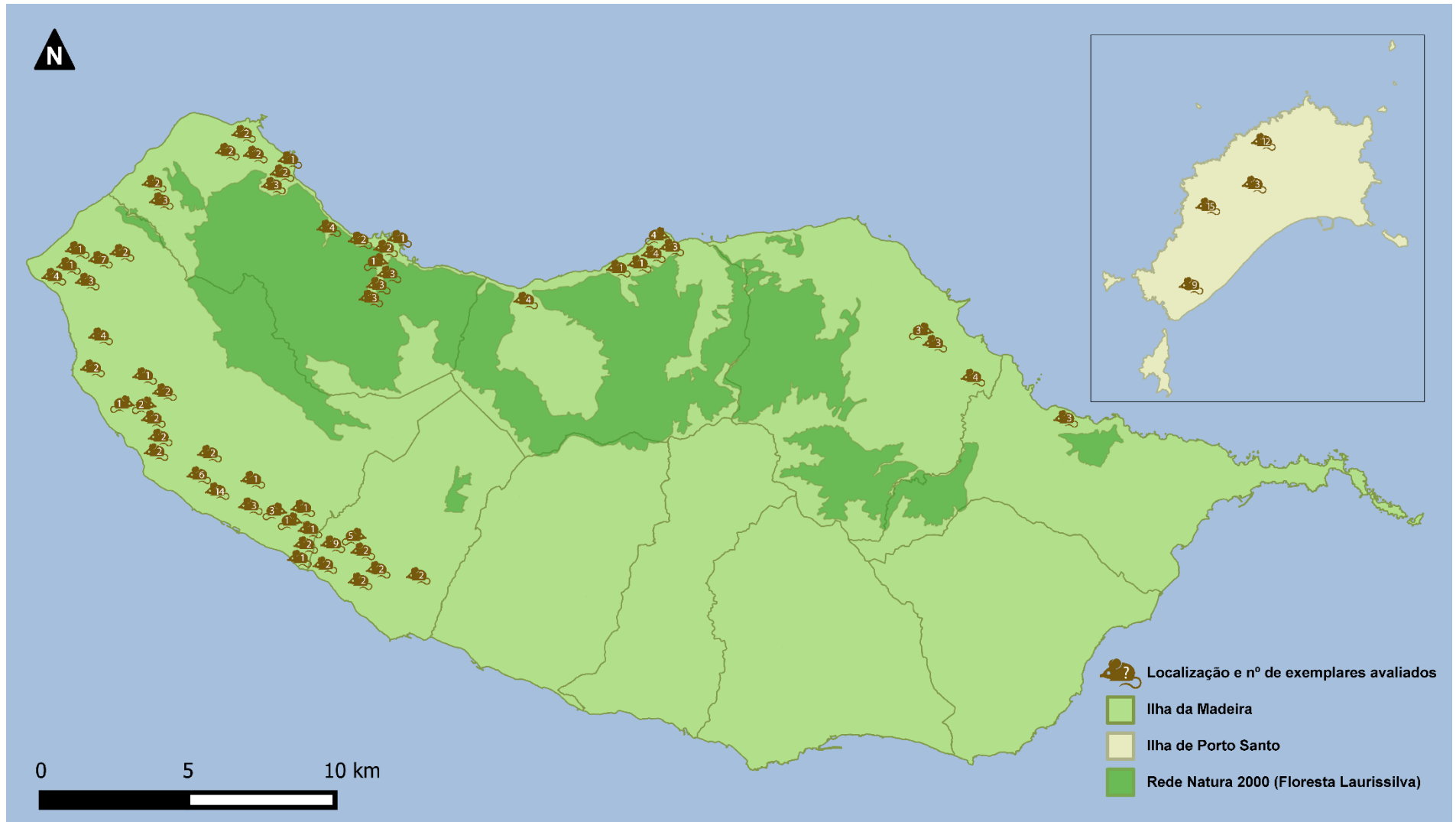
### **2.2. Distribuição da amostragem**

O número de exemplares capturados na ilha da Madeira teve a seguinte distribuição: Achadas da Cruz (5), Arco da Calheta (6), Canhas (2), Chão da Ribeira (9), Chão da Ribeira (I) (1), Chão da Ribeira (II) (2), Estreito da Calheta (20), Estreito da Calheta (Sítio da Camacha) (2), Faial (Lombo de Baixo) (4), Fajã da Ovelha (2), Levada Grande (2), Lombada dos Cedros (1), Lombada dos Marinheiros (4), Lombo do Doutor (Cemitério) (3), Lombo do Salão (1), Lugar da Raposeira I (1), Lugar da Raposeira II (2), Madalena do Mar (2), Madalena II - Arco da Cova da Calheta (1), Maloeira - Rua do Pico (2), Maloeira (I) (2), Maloeira (IV - Funerária) (2), Moledos (2), Ponta Delgada (11), Ponta Delgada (Lombada) (2), Ponta do Pargo (8), Ponta do Pargo - Ribeira da Vaca (1), Ponta do Sol (Levada da Serra) (2), Porto da Cruz (Larano) (3), Porto Moniz (2), Prazeres - Caminho do Miradouro (2), Ribeira da Janela (6), Ribeira da Laje (2), Ribeira da Vaca (7), Ribeira Funda (4), Salões (2), Santa (do Porto Moniz) (2), Santana (Feiteira do Nuno) (6), São Vicente - Terra Chã (4), Seixal - Sítio da Portada (1), Sítio da Fajã (9), Socorro (7), Solar dos Prazeres (2) (Figura 5).

No caso da ilha de Porto Santo o número de exemplares capturados teve a seguinte distribuição: Camacha (12), Farrobo (aeroporto) (3), Ponta (Centro Hípico) (9), Quinta das Palmeiras (15) (Figura 5).

Figura 5 – Mapa da ilha da Madeira e Porto Santo com a distribuição dos pontos de captura dos ratinhos *Mus musculus domesticus*.

15



Legenda – Localização e número de exemplares analisados em cada ponto da ilha da Madeira e da ilha de Porto Santo. É possível ver a área ocupada pela Floresta Laurissilva considerada Património Mundial pela UNESCO e pertencente à Rede Natura 2000.

### **2.3. Processamento laboratorial dos hospedeiros**

As armadilhas foram verificadas todas as manhãs e os animais capturados transferidos para gaiolas com ração e água *ad libitum*. Os animais foram, então, transportados para a Estação de Biologia Marinha do Funchal, onde foram processados. Foi feito o registo das coordenadas geográficas do local de captura bem como de diversas características morfológicas para cada indivíduo, nomeadamente o comprimento do corpo e cabeça, comprimento da cauda e peso. Posteriormente os exemplares analisados foram categorizados tendo em conta o sexo (machos e fêmeas) e faixa etária (juvenis [peso <12 g] e adultos [peso ≥12 g]) (Crowcroft & Rowe, 1961; MacDonald & Barrett, 1993; Battersby *et al.*, 2008). Foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical com anestesia prévia por isoflurano e de seguida realizada a necrópsia cuja data distou da altura de captura por um período máximo de uma semana. O sistema digestivo e fígado de cada ratinho foram colocados em etanol absoluto em tubos separados e devidamente identificados.

### **2.4. Extração dos helmintes**

A extração e isolamento dos helmintes foi realizada no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Para a análise individual dos órgãos foi utilizado material cirúrgico como bisturi, tesoura, pinças bico-de-pato e pinças dente-de-rato, e ainda placas de Petri, estiletos e pipetas de Pasteur. Uma vez que os órgãos se encontravam conservados em tubos com etanol absoluto, foi necessário o uso constante deste de forma a evitar a dessecação dos tecidos e dos parasitas durante a sua manipulação e identificação.

A disseção de cada órgão foi realizada individualmente em placas de Petri e sob o ME. Dependendo da presença ou não de parasitas e da sua quantidade, este processo chegou a ultrapassar a duração de 3 horas, dada a minúcia necessária na sua realização (Figura 6A).

Ao extrair o sistema digestivo do tubo, efetuou-se um corte ao nível do piloro para separação do estômago dos restantes órgãos. De seguida foi realizada uma incisão desde a cárdia ao piloro extraíndo de seguida o conteúdo estomacal o qual foi alvo de pesquisa de parasitas. A mucosa gástrica foi igualmente examinada para pesquisa de parasitas.

Após a separação do intestino delgado do intestino grosso, procedeu-se à incisão longitudinal deste em toda a sua extensão sendo cuidadosamente extraídos os parasitas e examinada a sua mucosa.

Relativamente ao intestino grosso, cego e cólon, foi realizada uma incisão longitudinal em toda a sua extensão, extraído o seu conteúdo e examinado para a presença de parasitas.

O conteúdo gastrointestinal foi conservado em etanol absoluto em tubos individuais adequadamente identificados.

Na análise do fígado, foram removidas as vesículas de natureza parasitária à superfície e realizada uma incisão para extração do parasita do seu interior. A presença de *Calodium*

*hepaticum* nos fígados dos ratinhos analisados foi determinada através da observação das lesões e escarificação quer da superfície do parênquima hepático quer da superfície de corte aquando da disseção do órgão, e sucessiva observação dos ovos.

Uma vez que os órgãos foram conservados em etanol absoluto, a rigidez dos tecidos e a fragilidade dos parasitas em questão nem sempre permitiram a obtenção de exemplares completos.

Os helmintes de cada espécie foram então separados por ratinho e colocados em etanol absoluto. Estes foram etiquetados com o respetivo código e sexo do animal, espécie do parasita presente, número de exemplares e respetivo género assim como a sua localização.

#### 2.4.1. Preparação dos helmintes

Após extração dos parasitas foi realizada montagem entre lâmina e lamela com Lactofenol d'Amann (Anexo C) para o seu esclarecimento, seguido de observação ao MOC (Crespo, 2012). Consoante a dimensão dos parasitas e número assim foram montadas lâminas apenas com 1 ou até 40 parasitas, como no caso de *Syphacia obvelata* (Figura 6B). Após a sua identificação foram lavados com etanol absoluto e colocados de novo nos tubos de origem.

Figura 6 – Ambiente de trabalho (A) e lâmina com montagem de 40 espécimes de *Syphacia obvelata* em Lactofenol d'Amann (B).



Para céstodes e tremátodes realizou-se a técnica de coloração pelo Carmim Álcool Clorídrico (Anexo D). Um dos requisitos desta técnica exige a colocação do parasita ainda vivo em água da torneira ou soro fisiológico, a 4°C durante cerca de 24h para que se dê a sua morte em extensão. Esta condição não foi possível uma vez que os órgãos se encontravam já

preservados em etanol absoluto pelo que foi apenas realizada numa pequena amostra de parasitas (4 espécimes de tremátodes e 5 espécimes de céstodes) (Crespo, 2012).

A técnica de coloração consiste na exposição dos parasitas a Ácido Álcool Clorídrico numa placa de Petri durante 10 minutos e sucessiva fixação com Etanol a 70°. De seguida sofreram diferenciação em Álcool Clorídrico a 1% sendo necessário controlar este processo sob o ME. Após a diferenciação sofreram desidratação por passagem em álcoois de concentrações crescentes (70°, 95° e 100°) e finalmente esclarecimento com Xilol e posterior montagem entre lâmina e lamela com Entellan (Figura 7A).

Figura 7 – Coloração de tremátodes e céstodes pelo Carmim Álcool Clorídrico (A) e técnicas coprológicas (B).



#### 2.4.2. Classificação das lesões hepáticas por *Calodium hepaticum*

O nível de envolvimento hepático nos hospedeiros positivos ao nemátode *Calodium hepaticum* foi classificado de acordo com Conlogue, Foreyt, Adess & Levine (1979) e Pereira (2009). Para este efeito, foram adotados três graus de intensidade:

- Leve (intensidade 1) – envolvimento dos bordos hepáticos ou lesões discretas e amplamente dispersas num único lóbulo hepático;
- Moderado (intensidade 2) – maior número de lesões que o grau anterior mas envolvendo até metade do fígado;
- Grave (intensidade 3) – envolvimento de mais de metade do fígado.

#### 2.4.3. Contagem de ovos de *Calodium hepaticum*

Após escarificação de 14 fígados que se revelaram positivos a *Calodium hepaticum* procedeu-se a uma tentativa da contagem de ovos dos mesmos. Realizaram-se 5 raspagens com recurso a um bisturi, 3 à superfície do fígado e 2 nas superfícies de corte após incisão do órgão. Ao produto de raspagem foram adicionados 100 µL de água destilada, tendo sido

retirados de seguida 25 µl que foram montados entre lâmina e lamela (24 x 24 mm) e observados ao MOC (objetiva de 10x). Foi realizada a contagem da totalidade dos ovos com recurso a um contador manual e ainda a contagem de ovos em três campos microscópicos diferentes sendo realizada posteriormente a sua média.

#### **2.4.4. Técnicas coprológicas**

Foram realizadas técnicas coprológicas qualitativas a 18 ratinhos. Estas técnicas consistiram na técnica de Flutuação pelo método de Willis e Sedimentação Natural e ainda esfregaço do conteúdo intestinal e coloração Ziehl-Neelsen (Anexo E). Sendo estas técnicas qualitativas, o protocolo, material e quantidades de solução saturada foram adaptadas perante a reduzida quantidade de conteúdo intestinal das amostras (Figura 7B).

#### **2.4.5. Técnicas histológicas**

Um conjunto de 18 fígados constituído por fígados sem lesões visíveis, com lesões típicas de *Calodium hepaticum*, com vesículas compatíveis com *Cysticercus fasciolaris* e vesículas de *Cysticercus* sp. foi analisado pelo Laboratório de Anatomia Patológica da FMV/ULisboa, onde foram submetidos a análise histopatológica. Para esta análise, foi colhido um fragmento de cada fígado com espessura inferior a 5 mm e fixado em Formol tamponado a 10%, durante um período de 24 horas. O processamento e inclusão dos tecidos em parafina foram efetuados com recurso ao processador de tecidos LEICA TP 1020. O corte dos blocos de parafina resultantes foi realizado com recurso a um micrótomo de Minot apresentando uma espessura de cerca de 3 µm. Posteriormente foram desparafinados, hidratados e corados pela coloração da Hematoxilina de Gill II e Eosina-Floxina. Por último foram analisados ao MOC e os resultados registados em relatório interno de análise histopatológica.

### **2.5. Identificação dos helmintes**

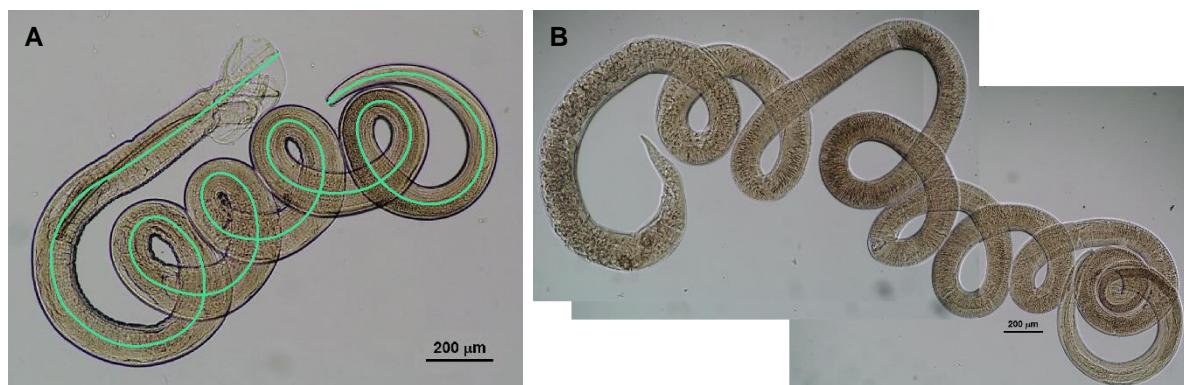
A identificação dos helmintes foi possível com recurso ao ME (Olympus SZ40) e MOC (Olympus BX40 e Olympus CX31). O registo fotográfico foi feito com o recurso à câmara digital compacta (Olympus SP-500 UZ) acoplada ao ME (Olympus SZ51) e com a câmara (Olympus DP10) acoplada ao MOC (Olympus BX50) o qual foi ainda utilizado para as medições dos parasitas.

De forma a fazer a medição do comprimento de alguns parasitas (*Heligmosomoides polygyrus*), dada a complexidade da sua forma, foi necessário recorrer ao *software* de imagem Adobe® Illustrator® CS6 (Figura 8A e 8B).

A identificação e classificação dos parasitas extraídos dos exemplares de *Mus musculus domesticus* foi realizada com base em diversas obras e artigos de referência, entre os quais há que destacar: Skrjabin (1964), Cribb (1990), Cribb (1992) e Butcher & Grove (2001) para tremátodes; Euzeby (1981), Euzeby (1982), Petter & Quentin (1976), Chabaud (1975),

Chabaud (1978) e Durette-Desset (1983) para nemátodes; Wardle & McLeod (1968) para céstodes e Dailey (1996) e Pritchett (2007) para helmintes em geral. Igualmente, a identificação de ovos provou ser um auxílio à identificação dos respetivos parasitas adultos, sendo de destacar as seguintes obras: Thienpont, Rochette & Vanparijs (1979) e Zajac & Conboy (2012).

Figura 8 – Medição do comprimento (linha verde) de um exemplar macho de *Heligmosomoides polygyrus* (A) e composição de fotografias de um exemplar fêmea de *H. polygyrus* (B) pelo software de imagem Adobe® Illustrator® CS6.



## 2.6. Registos e análise dos dados

Os dados recolhidos no decurso do trabalho foram introduzidos e processados em folhas de cálculo através do programa *Microsoft Office Excel* 2013. A informação referente à distribuição dos exemplares pelas duas ilhas, Madeira e Porto Santo, foi processada com recurso ao programa QGIS (versão 2.10.1 - Pisa) e ao software de imagem Adobe® Illustrator® CS6 para elaboração dos mapas.

## 2.7. Análise estatística

A análise dos dados foi efetuada recorrendo aos programas de estatística *GraphPad Prism*®, versão 6.01 e *IBM® SPSS® Statistics*, versão 22.

Foi testada a normalidade dos dados com recurso ao teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a análise das prevalências foi calculado o Intervalo de Confiança para 95% (IC95%) (Sergeant, 2015) sendo que a análise estatística foi realizada com recurso ao teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) e teste exacto de Fisher (F). A análise das intensidades foi efetuada somente para parasitas cujos valores de prevalência fossem iguais ou superiores a 10% da amostra (Bush, Aho & Kennedy, 1990), recorrendo para o efeito ao teste U de Mann-Whitney, não paramétrico, sendo previamente realizado o teste de Levene para verificação de homogeneidade de variâncias, sendo que para a realização do teste U de Mann-Whitney é necessário que ambos os grupos a comparar possuam variâncias iguais (Zimmermann, 1987).

Consideraram-se estatisticamente significativas as associações cujo valor de significância  $p$  do teste adotado fosse inferior ou igual a 0,05.

## **2.8. Conceitos adotados no estudo parasitológico**

Foram adotados os seguintes conceitos com base nos artigos de Margolis, Esch, Holmes, Kuris e Schad (1982) e Bush, Lafferty, Lotz e Shostak (1997):

- Prevalência (geralmente expressa em percentagem) – número de indivíduos de uma espécie hospedeira infetada com uma determinada espécie de parasita a dividir pelo número total de hospedeiros examinados.
- Intensidade (expressa frequentemente em intervalo numérico) – número de indivíduos (determinado direta ou indiretamente) de uma determinada espécie parasita presente em cada hospedeiro infetado da amostra (i.e., numa infrapopulação).
- Intensidade média – número total de indivíduos de uma determinada espécie de parasita presente numa amostra de hospedeiros a dividir pelo número de indivíduos infetados da amostra por essa espécie parasita, ou seja, corresponde à média do número de indivíduos de uma determinada espécie de parasita por hospedeiro infetado da amostra.
- Infrapopulação – todos os indivíduos de uma espécie parasita presentes num indivíduo hospedeiro num determinado momento.
- Local/Localização [no hospedeiro] – tecido, órgão ou parte de um hospedeiro onde o parasita é encontrado. (*Habitat* diz respeito não só à localização espacial do parasita como também ao ambiente físico e químico que o envolve, não devendo consequentemente ser usado como sinónimo de Localização ou Local).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Apresentação dos Resultados

##### 3.1.1. Composição qualitativa da Helmintofauna gastrointestinal e hepática de *Mus musculus domesticus* no Arquipélago da Madeira

No decurso da análise de 200 exemplares de ratinho-caseiro *Mus musculus domesticus* foram identificadas 12 espécies de parasitas. Do Filo Plathelminthes foi identificada 1 espécie da Classe Trematoda (*Brachylaima* sp.) e 4 espécies da Classe Cestoda (*Cysticercus fasciolaris* [forma larvar de *Taenia taeniaeformis*], *Cysticercus* sp. [forma larvar de *Taenia* sp.], *Hymenolepis diminuta* e *Rodentolepis nana*). Do Filo Nematoda foram identificadas 7 espécies (*Calodium hepaticum*, *Gongylonema neoplasticum*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Heterakis spumosa*, *Mastophorus muris*, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*) (Anexo F).

###### 3.1.1.1. *Brachylaima* sp. Dujardin, 1845

A Família Brachylaimidae é uma família bastante ampla, que engloba várias espécies, algumas com descrições insuficientes que datam do século XIX. O género *Brachylaima* é particularmente confuso uma vez que o seu *taxon* já sofreu variações significativas na literatura, os seus ciclos biológicos são descritos de forma incompleta ou insuficiente e existe um grande número de espécies morfológicamente semelhantes entre si. É possível encontrar num mesmo local, mais do que uma espécie cujos adultos são morfológicamente indistinguíveis entre si, sendo essencial conhecimentos sobre os seus ciclos biológicos para a sua distinção (Mas-Coma & Montoliu, 1986; Cribb, 1990; Cribb, 1992; Butcher & Grove, 2001). Thomas Cribb referiu que o género *Brachylaima* é tão amplo que hoje em dia é necessário associar técnicas de biologia molecular de forma a ter uma identificação confiante da espécie em questão (comunicação pessoal, Junho 10, 2015).

Segundo os autores Butcher & Grove (2001), existem pelo menos 22 espécies de *Brachylaima*, não indígenas da Austrália, que afetam frequentemente roedores. Muitas destas espécies apresentam características morfológicas bastante semelhantes entre si.

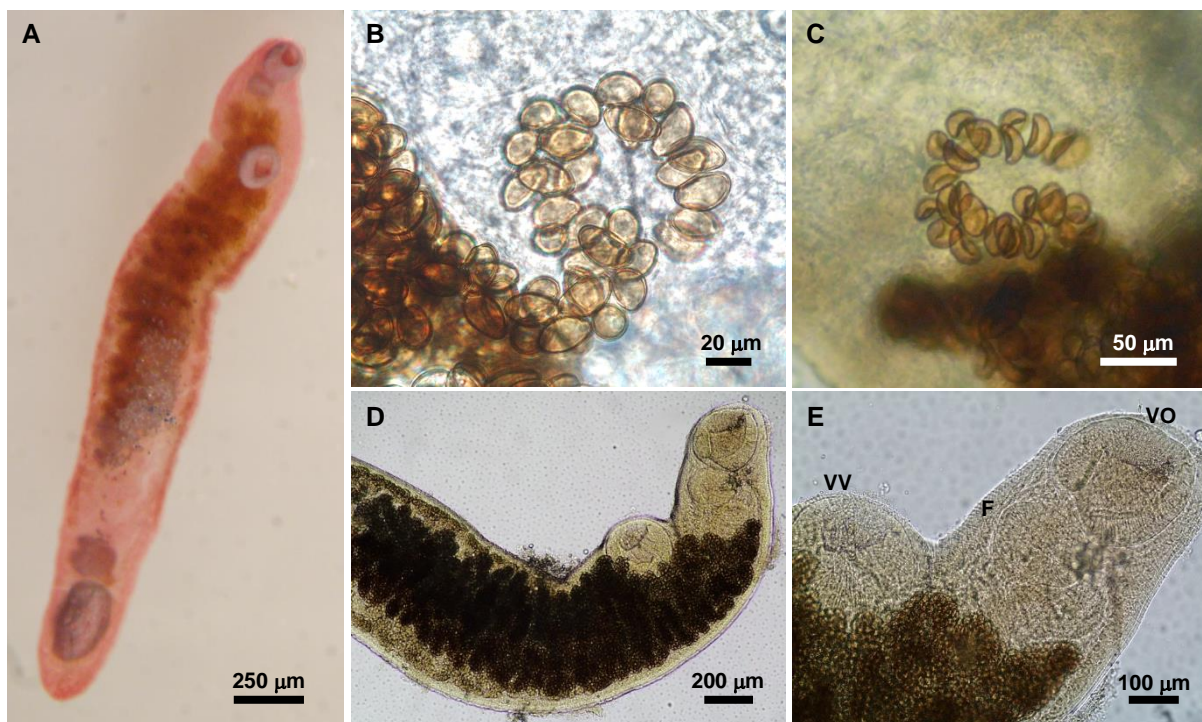
De forma a diferenciar as várias espécies do género *Brachylaima*, são essenciais medições morfológicas de todos os estádios do ciclo biológico, informação sobre o próprio ciclo biológico, especificidade de hospedeiro e distribuição geográfica (Butcher & Grove, 2001).

De nosso conhecimento, parece ser a primeira vez que este género é descrito no Arquipélago da Madeira. O desconhecimento dos hospedeiros intermediários intervenientes no ciclo biológico deste parasita, bem como das suas formas larvares não permitiu fazer uma identificação ao nível da espécie.

### 3.1.1.1.1. Morfologia

Os parasitas adultos aquando da sua extração do intestino delgado apresentavam uma coloração esbranquiçada à periferia e no interior uma coloração mais escura devido ao conteúdo sanguíneo proveniente da sua alimentação do tipo hematófaga. Os parasitas adultos (Figura 9A) possuíam em média cerca de 3165,6  $\mu\text{m}$  de comprimento (2400-3525  $\mu\text{m}$ ) e 668,8  $\mu\text{m}$  de largura (525-820  $\mu\text{m}$ ). Apresentavam duas ventosas no terço anterior do corpo, a ventosa oral apresentou cerca de 290  $\mu\text{m}$  de diâmetro longitudinal e 286,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro transversal, com a ventosa ventral a medir cerca de 305  $\mu\text{m}$  de diâmetro longitudinal e 317,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro transversal (Figura 9D). Entre estas duas ventosas observou-se uma estrutura morfológicamente semelhante mas de dimensões inferiores correspondendo à faringe, possuindo cerca de 171,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro longitudinal e 208,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro transversal (Figura 9E). A maior parte dos parasitas adultos observados apresentava ovos no seu interior que mediram em média 27,9  $\mu\text{m}$  de comprimento e 17,1  $\mu\text{m}$  de largura (Figuras 9B e C).

Figura 9 – Observação em ME (A) e MOC (B, C, D, E) de exemplares adultos de *Brachylaima* sp.



A - Exemplar adulto corado pelo Carmim Álcool Clorídrico; B - ovos no interior de um exemplar adulto; C - pormenor dos ovos em forma de “hemácia”; D - extremidade anterior de um exemplar adulto; E - pormenor da ventosa oral (VO), faringe (F) e ventosa ventral (VV) (originais).

Foi realizada a técnica de Coloração de Tremátodes e Céstodes pelo Carmim Álcool Clorídrico (Anexo D) na tentativa de otimizar a observação e identificação das estruturas internas do parasita (Figura 9A). Contudo, a premissa base desta coloração que consiste em colocar o parasita em água da torneira ou soro fisiológico, no frigorífico a 4°C durante cerca de 24 horas

para que se dê a morte em extensão, não foi possível uma vez que os sistemas digestivos se encontravam originalmente conservados em tubos com etanol absoluto. Deste modo, os parasitas sofreram retração dos tecidos durante o processo de coloração inviabilizando medições das suas estruturas morfológicas para posterior comparação. A coloração em si não foi completamente bem-sucedida, pelo que a observação das estruturas internas foi apenas possível ao ME, com todas as condicionantes que este equipamento tem relativamente a estruturas microscópicas.

Os espécimes encontrados e identificados assemelham-se a *Brachylaima cribbi* (Cribb, 1990; Butcher & Grove, 2001; Butcher, Brealey, Grove & Dymock, 2002), contudo esta comparação é feita apenas entre indivíduos adultos, não tendo em conta o ciclo biológico (à exceção do hospedeiro definitivo) e a morfologia dos vários estádios do mesmo, sendo esta informação insuficiente para a correta identificação da espécie. Estudos da morfologia das cercárias e análises moleculares em paralelo com os estudos anteriormente descritos, podem levar à identificação definitiva das espécies deste género de tremátodes (Cribb, 1990).

### 3.1.1.1.2. Hospedeiros

*Brachylaima* é um género de parasita que infeta mamíferos e aves, localizando-se no intestino delgado destas espécies (Cribb & O'Callaghan, 1992; Butcher & Grove 2001; Naupay-Igreda, Pinedo-Reyes & Robles-Noriega, 2014) (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de *Brachylaima* spp.

Hospedeiro Definitivo	Hospedeiro Intermediário Primário	Hospedeiro Intermediário Secundário
<p><b>Mamíferos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mamíferos marsupiais;</li> <li>▪ Roedores (<i>Mus musculus</i>, <i>Rattus norvegicus</i>, <i>Rattus fuscipes</i>, <i>Leporillus conditor</i>).</li> </ul> <p><b>Aves:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Galinha;</li> <li>▪ <i>Columba livia</i> (Pombo).</li> </ul>	<p><b>Moluscos terrestres:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Caracóis (<i>Cerņuella virgata</i>, <i>Cochlicella barbara</i>, <i>Theba pisana</i>, <i>Rumina decollata</i>).</li> </ul>	<p><b>Moluscos terrestres:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Caracóis (<i>Cerņuella virgata</i>, <i>Cochlicella barbara</i>, <i>Cochlicella acuta</i>, <i>Theba pisana</i>, <i>Rumina decollata</i>, <i>Helix aspersa</i>, <i>Otala punctata</i>, <i>Eobania vermiculata</i>);</li> <li>▪ <i>Ferussacia follicula</i> (Lesma).</li> </ul>
<p>Referências: Afonso-Roque, <i>et al.</i> (1984); Mas-Coma &amp; Montoliu (1986); Cribb (1990); Cribb &amp; O'Callaghan (1992); Butcher <i>et al.</i> (1996); Butcher &amp; Grove (2001); Naupay-Igreda <i>et al.</i> (2014).</p>		

Os roedores, entre os quais o ratinho-caseiro, podem ser infetados pelas seguintes espécies de *Brachylaima*: *B. cribbi* (Butcher & Grove, 2001), *B. advena*, *B. recurvum*, *B. aequans*, *B. nitellae*, *B. ruminiae* e *B. suis* (Cribb, 1990).

### 3.1.1.1.3. Distribuição geográfica

*Brachylaima recurva* foi descrita em Portugal por Afonso-Roque *et al.* (1984). Na Austrália foram já descritas diversas espécies do género *Brachylaima* sendo que se acredita ter sido devida à introdução de moluscos helicídeos infetados provenientes da Europa (Cribb, 1990;

Butcher & Grove, 2001). Estão ainda descritas espécies de *Brachylaima* em roedores na Nova Zelândia (Cribb, 1990) e em pombos domésticos no Peru (Naupay-Igreda *et al.*, 2014).

#### **3.1.1.1.4. Ciclo Biológico**

O ciclo biológico dos parasitas da Família Brachylaimidae é semelhante entre as várias espécies, caracterizando-se por ser um ciclo biológico terrestre triheteroxeno. O primeiro hospedeiro intermediário, um caracol terrestre, ingere fezes contaminadas com ovos de *Brachylaima* sp.. A cercária desenvolve-se, a partir dos esporocistos ramificados na glândula digestiva do molusco, e abandona o primeiro caracol invadindo o segundo hospedeiro intermediário, também este um caracol terrestre, desenvolvendo-se em metacercária no rim. O hospedeiro intermediário secundário é então ingerido pelo hospedeiro definitivo, onde se desenvolve o parasita adulto no intestino delgado. Neste estágio do ciclo biológico, a alimentação do parasita é do tipo hematófaga. Os adultos grávidos podem ser encontrados em *Mus musculus*, 6 dias após infecção (Mas-Coma & Montoliu, 1986; Cribb & O'Callaghan, 1992).

#### **3.1.1.1.5. Potencial Zoonótico**

Os humanos são hospedeiros definitivos acidentais. São raros os casos de infecção por tremátodes do género *Brachylaima*, contudo estão descritos na literatura pelo menos 3 casos de infecções humanas de *Brachylaima*, na Austrália, dois casos em crianças e um caso num adulto (Butcher *et al.* 1996; Butcher, Parasuramar, Thompson & Grove, 1998).

Meerburg *et al.* (2009) descrevem as consequências relativamente à infecção por *Brachylaima*, sendo a população em risco do tipo focal e a probabilidade de infecção baixa, a mortalidade situa-se entre 5 a 10% na ausência de tratamento e as perdas económicas associadas a esta doença são baixas.

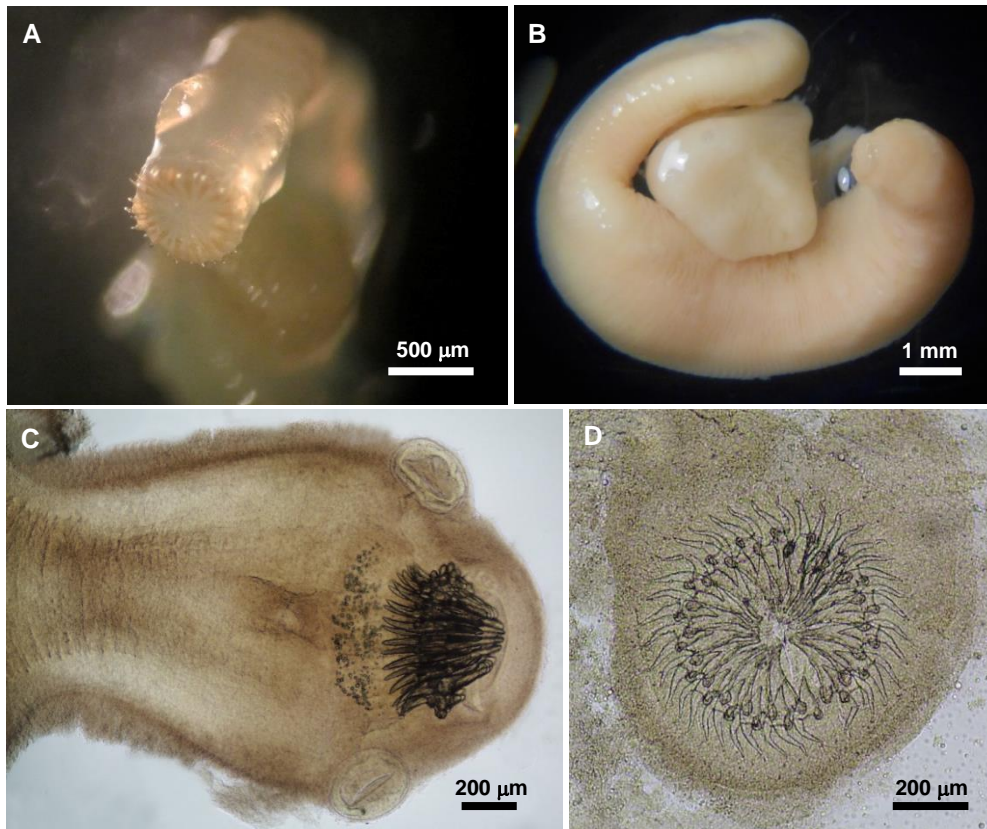
#### **3.1.1.2. *Cysticercus fasciolaris* forma larvar de *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) Wolffugel, 1911**

##### **3.1.1.2.1. Morfologia**

As formas larvares de *Taenia taeniaeformis*, *Cysticercus fasciolaris*, foram extraídas de vesículas presentes no parênquima hepático, encontrando-se na sua maioria proeminentes à superfície do fígado. A maior parte dos animais apresentava apenas uma vesícula (uma média de 1,3 vesículas por animal [1-5 vesículas]), contudo foram esporadicamente encontrados animais parasitados com 2, 4 e 5 vesículas. As vesículas apresentavam em média cerca de 7,1 mm de diâmetro (3-10 mm) e no interior de cada uma delas encontrava-se a larva do tipo estrobilocerco, de coloração esbranquiçada, cujo estróbilo se apresentava longo e pseudosegmentado medindo em média cerca de 23 mm de comprimento (5-94 mm) (Figura 10B). Na extremidade anterior do estrobilocerco foi possível observar 4 ventosas e o

protoescólex constituído por um rostelo evaginado, armado com uma dupla coroa de ganchos perfazendo um total de 30 a 38 ganchos (Figuras 10A, C e D). Na literatura está descrito que o número de ganchos pode variar entre 26 e 52 (Samuel, Pybus & Kocan, 2001).

Figura 10 – Observação em ME (A, B) e MOC (C, D) de *Cysticercus fasciolaris*, forma larvar de *Taenia taeniaeformis*.



A – Estrobilocerco, pormenor do protoescólex com a dupla coroa de ganchos e ventosas; B - estrobilocerco; C - extremidade anterior de um estrobilocerco, pormenor do escólex com a dupla coroa de ganchos e ventosas; D - extremidade anterior de um estrobilocerco, pormenor da dupla coroa de ganchos (originais).

### 3.1.1.2.2. Hospedeiros

*Taenia taeniaeformis* caracteriza-se por ser a ténia mais comum no gato, sendo que os roedores desempenham o papel de hospedeiros intermediários (Tabela 2).

Tabela 2 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários respectivamente de *Taenia taeniaeformis* (forma adulta) e *Cysticercus fasciolaris* (forma larvar).

Hospedeiro Definitivo	Hospedeiro Intermediário
<b>Carnívoros:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Arminho;</li> <li>▪ Cão;</li> <li>▪ Felídeos (<i>Felis catus</i>, <i>F. rufus</i>, <i>F. silvestris</i>, <i>Lynx unita</i>);</li> <li>▪ Híbridos de coioete e lobo (<i>Canis latrans</i> x <i>rufus</i>);</li> <li>▪ <i>Vulpes vulpes</i> (Raposa).</li> </ul>	<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Coelho;</li> <li>▪ Homem;</li> <li>▪ Morcego;</li> <li>▪ Roedores (<i>Acomys cahirinus</i>, <i>Apodemus argenteus</i>, <i>A. microps</i>, <i>A. speciosus</i>, <i>Arvicanthis niloticus</i>, <i>Gerbillus gerbillus</i>, <i>Meriones persicus</i>, <i>Mesocricetus auratus</i>, <i>Microtus agrestis</i>, <i>M. arvalis</i>, <i>M. pennsylvanicus</i>, <i>M. pinetorum</i>, <i>Mus musculus</i>, <i>M. spretus</i>, <i>Myocastor coypus</i>, <i>Ondatra zibethicus</i>, <i>Peromyscus maniculatus</i>, <i>Phyllotis xanthopygus</i>, <i>Pitymys savii</i>, <i>P. subterraneus</i>, <i>Rattus norvegicus</i>, <i>R. rattus</i>, <i>Sciurus carolinensis carolinensis</i> e <i>Sigmodon hispidus</i>).</li> </ul> <b>Ocasionalmente aves:</b> <i>Bubo bubo</i> e <i>Phasianus colchicus</i> .
Referências: Soulsby (1968); Afonso-Roque <i>et al.</i> (1984); Jithendran & Somvanshi (1998); Samuel <i>et al.</i> (2001); Ito & Itagaki (2003); Baker (2007); Pereira (2009); Al-Jashamy (2010); Rodríguez-Vivas, Panti-May, Parada-López, Hernández-Betancourt & Ruiz-Pinã (2011); Crespo (2012); Jia <i>et al.</i> (2012).	

### 3.1.1.2.3. Distribuição geográfica

Apresenta uma distribuição geográfica cosmopolita (Jithendran & Somvanshi, 1998; Baker, 2007; Jia *et al.* 2012).

### 3.1.1.2.4. Ciclo Biológico

Após ingestão de água e/ou alimentos contaminados com oncosferas eliminadas pelo gato, o embrião hexacanto presente no interior destas eclode e migra através da parede intestinal do roedor atingindo o fígado, ou em raras ocasiões o peritoneu, onde se desenvolve em metacéstode do tipo estrobilocerco. São necessários cerca de 40 a 60 dias para a sua maturação, período findo o qual se torna infetante. Ao ingerir o roedor infetado com o estrobilocerco (*C. fasciolaris*) o gato torna-se o hospedeiro definitivo, albergando a forma adulta do céstode (*T. taeniaeformis*) no seu intestino delgado. O parasita recorre às estruturas presentes no seu escólex, dupla coroa de ganchos e ventosas, para a fixação à mucosa intestinal sendo o seu período de latência entre 16 a 18 dias (Soulsby, 1968; Dunn, 1983; Jithendran & Somvanshi, 1998; Baker, 2007; Al-Jashamy, 2010; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011; Bowman, 2014; McInnes *et al.*, 2014).

### 3.1.1.2.5. Potencial Zoonótico

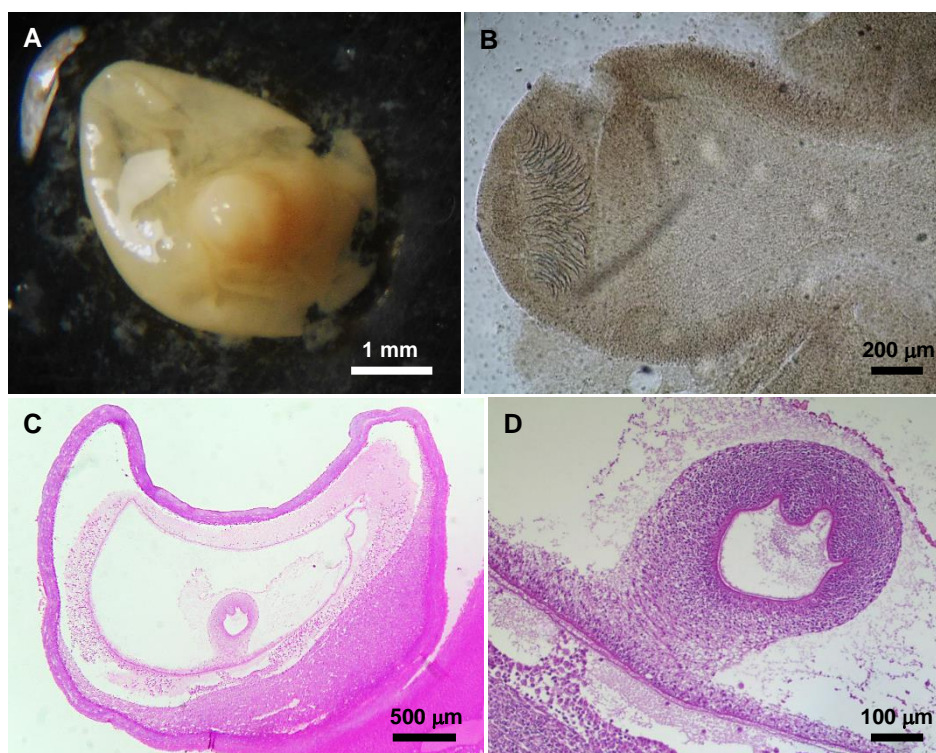
Estão reportados casos esporádicos de infeção humana por este céstode, nomeadamente na Argentina, antiga Checoslováquia, Dinamarca e Taiwan (Al-Jashamy, 2010). Estes casos reportados dizem respeito a infeções humanas quer pela forma larvar, quer pela forma adulta do parasita. O ser humano ao ingerir o fígado de um roedor ou lagomorfo parasitado com o estrobilocerco (*C. fasciolaris*) pode ficar infetado com o respetivo parasita adulto, que se fixa ao nível da mucosa do intestino delgado (Baker, 2007); ao ingerir água e/ou alimentos contaminados com fezes provenientes de um gato infetado, o indivíduo pode vir a desenvolver a forma larvar no fígado (Samuel *et al.* 2001).

### 3.1.1.3. *Cysticercus* sp. forma larvar de *Taenia* sp.

#### 3.1.1.3.1. Morfologia

As vesículas contendo as formas larvares do céstode foram extraídas do parênquima hepático, encontrando-se algumas delas à superfície do fígado. A maior parte dos animais apresentava apenas uma vesícula (numa média de 1,3 vesículas por animal [1-4 vesículas]) (Figura 11A). Estas vesículas apresentavam em média cerca de 3,9 mm de diâmetro (2-6 mm) e no seu interior encontrava-se a larva do tipo cisticerco, cuja coloração variava de transparente a esbranquiçada (Figura 11C e D). Após extração cuidadosa do metacéstode do interior da vesícula, foi possível observar a invaginação cefálica com apenas um protoescólex contendo uma dupla coroa de ganchos (Figura 11B).

Figura 11 – Observação em ME (A) e MOC (B, C, D) de *Cysticercus* sp., possível forma larvar de *Taenia polyacantha*.



A - Protoescólex após incisão do cisticerco exteriorizado da vesícula; B - cisticerco, pormenor da dupla coroa de ganchos; C, D - corte histológico hepático de uma vesícula com o cisticerco no seu interior e pormenor do protoescólex (originais).

Este metacéstode poderá tratar-se da forma larvar da *Taenia polyacantha* nomeadamente *Taenia polyacantha arctica* (Samuel *et al.*, 2001). A forma larvar da *Taenia polyacantha* apresenta um rostelo com uma dupla coroa de ganchos que varia entre 44 e 68 ganchos, sendo que os da primeira coroa apresentam valores na ordem de 178-234 µm e os da segunda medem cerca de 120-182 µm (Haukisalmi & Henttonen, 1993; Samuel *et al.*, 2001).

### 3.1.1.3.2. Hospedeiros

*Taenia polyacantha* apresenta um ciclo biológico heteroxeno, sendo que os roedores desempenham o papel de hospedeiros intermediários e os carnívoros de hospedeiros definitivos (Tabela 3).

Tabela 3 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários respetivamente de *Taenia polyacantha* (forma adulta) e metacéstode (forma larvar).

Hospedeiro Definitivo	Hospedeiro Intermediário
<b>Carnívoros:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <i>Alopex lagopus</i>, <i>Canis familiaris</i>, <i>C. lupus</i>, <i>Nyctereutes procyonides</i>, <i>Vulpes vulpes</i>.</li></ul>	<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Lagomorfos (<i>Ochotona pricei</i>, <i>Oryctolagus cuniculus</i>);</li><li>▪ Roedores (<i>Apodemus flavicolis</i>, <i>Clethrionomys glareolus</i>, <i>C. rufocanus</i>, <i>Lagurus lagurus</i>, <i>Lemmus sibiricus</i>, <i>Microtus arvalis</i>, <i>M. gregalis major</i>, <i>M. miurus</i>, <i>M. oeconomus</i>).</li></ul>
Referências: Tenora, Beránek & Staněk (1988); Haukisalml & Henttonen (1993); Samuel <i>et al.</i> (2001).	

### 3.1.1.3.3. Distribuição geográfica

Este parasita encontra-se maioritariamente no Hemisfério Norte (Samuel *et al.*, 2001).

### 3.1.1.3.4. Ciclo Biológico

Os ovos são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo, sendo ingeridos pelo hospedeiro intermediário, nomeadamente o roedor, através da ingestão de alimentos e/ou água contaminados. Uma particularidade desta espécie é a multiplicação assexual das larvas nos roedores podendo encontrar-se nas cavidades pleural e peritoneal. As oncosferas chegam ao fígado pela via sanguínea onde se desenvolvem em pequenas vesículas primárias. Cerca de 6 a 10 dias pós-infeção, migram para a cavidade peritoneal onde se dividem em várias vesículas secundárias. Estas vesículas dissociam-se e cada uma dá origem a um cisticerco cerca de 30 a 40 dias pós-infeção. Cerca de 60 dias após a infeção inicial, a larva do tipo cisticerco sofre uma série de modificações originando uma larva com uma vesícula posterior, um estróbilo achatado e pseudosegmentado e um escólex evaginado. As larvas tornam-se infetantes ao fim de 41 dias. O céstode adulto habita o intestino delgado do hospedeiro definitivo (Fugita *et al.*, 1991; Haukisalml & Henttonen, 1993; Samuel *et al.*, 2001).

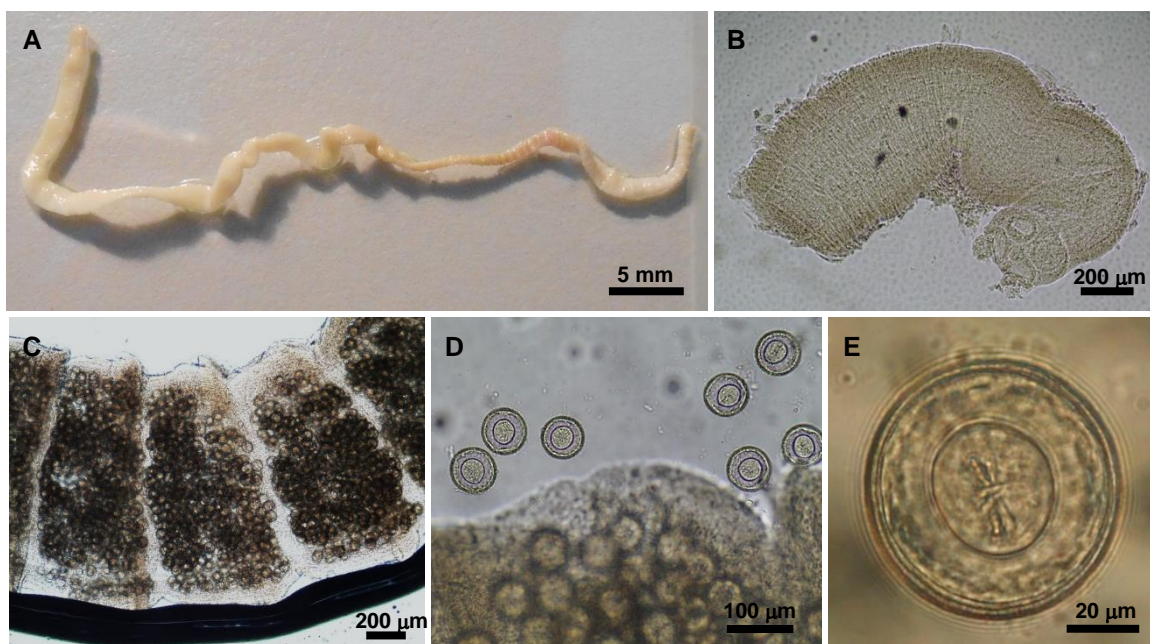
### 3.1.1.4. *Hymenolepis diminuta* Rudolphi, 1819

#### 3.1.1.4.1. Morfologia

O único exemplar de *Hymenolepis diminuta*, conhecido como o “céstode dos ratos”, foi extraído do conteúdo intestinal, ao nível do intestino delgado de um ratinho (Figura 12A). O parasita encontrava-se incompleto, contudo a porção extraída media pelo menos 7 cm de comprimento e 1483,3 µm de largura. Os registos existentes na literatura atual descrevem que este céstode pode apresentar um comprimento entre 20 a 60 cm de comprimento, podendo chegar a atingir 1 m, e 3 a 4 mm de largura (Newcomer & Fox, 2007; Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2013a). O escólex deste parasita, de 330 µm de

largura e 250  $\mu\text{m}$  de comprimento, apresentava um pequeno rostelo piriforme e inerme (desprovido de ganchos), assim como 4 ventosas com cerca de 125  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 12B). Os proglótes grávidos apresentavam-se mais largos que compridos. Os ovos, praticamente esféricos, apresentavam em média 71,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 69,3  $\mu\text{m}$  de largura, e no seu interior observou-se o embrioforo, cujo comprimento foi em média de 38,8  $\mu\text{m}$  e com largura de 35  $\mu\text{m}$ , que por sua vez continha no seu interior o embrião hexacanto (Figuras 12C, D e E).

Figura 12 – Observação em ME (A) e MOC (B, C, D, E) de um espécime de *Hymenolepis diminuta*.



A - Estróbilo incompleto; B - extremidade anterior, pormenor do escólex inerme e das 4 ventosas; C - proglótes grávidos; D - ovos praticamente esféricos; E - pormenor de um ovo com o embrião hexacanto no seu interior (originais).

### 3.1.1.4.2. Hospedeiros

O céstode *H. diminuta* caracteriza-se por ter um ciclo biológico heteroxeno, no qual os mamíferos desempenham o papel de hospedeiros definitivos e os invertebrados o papel de hospedeiros intermediários (Tabela 4).

Tabela 4 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de *Hymenolepis diminuta*.

Hospedeiro Definitivo	Hospedeiro Intermediário Invertebrado
<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cão (ocasionalmente);</li> <li>▪ Primatas (incluindo o Homem);</li> <li>▪ Roedores (<i>Apodemus argenteus</i>, <i>A. speciosus</i>, <i>Mus musculus</i>, <i>Rattus norvegicus</i>, <i>Rattus rattus</i>).</li> </ul>	<b>Artrópodes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Coleópteros (<i>Tenebrio molitor</i>, <i>Tribolium confusum</i>);</li> <li>▪ Lepidópteros;</li> <li>▪ Sifonápteros (<i>Nosopsyllus fasciatus</i>, <i>Xenopsylla cheopis</i>).</li> </ul>
Referências: Afonso-Roque <i>et al.</i> (1984); Tena <i>et al.</i> (1998); Andreassen, Bennet-Jenkins & Bryant (1999); Ito & Itagaki (2003); Baker (2007); Newcomer & Fox (2007); Pereira (2009); Roberts & Janovy (2009); Ortuño & Castellà (2011); Crespo (2012); Bowman (2014).	

#### **3.1.1.4.3. Distribuição geográfica**

Distribuição cosmopolita (Tena *et al.*, 1998; Andreassen *et al.*, 1999).

#### **3.1.1.4.4. Ciclo Biológico**

Os ovos libertados nas fezes são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, frequentemente um escaravelho. A oncosfera eclode, havendo a libertação do embrião hexacanto, que inicia o seu desenvolvimento em larva cisticercóide por um período geralmente de 8-10 dias, findo o qual se torna infetante. A infeção do hospedeiro definitivo, neste caso o ratinho-caseiro, ocorre após ingestão do artrópode infetado. Aquando da libertação da larva cisticercóide, ocorre evaginação do escólex e fixação do parasita à mucosa intestinal, que atinge a maturidade ao fim de 19 a 21 dias, altura em que se dá a eliminação dos ovos nas fezes (Andreassen *et al.*, 1999; Baker, 2007; Newcomer & Fox, 2007; CDC, 2013) (Anexo I).

#### **3.1.1.4.5. Potencial Zoonótico**

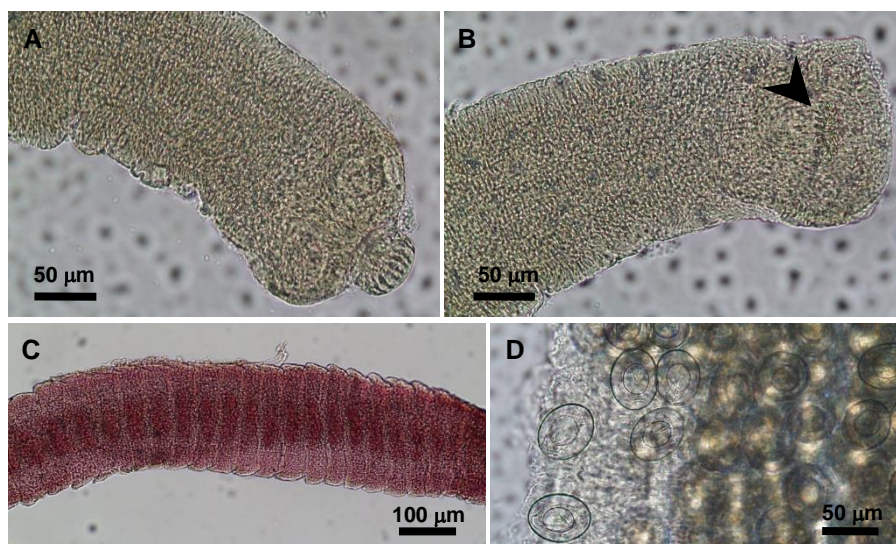
A infeção humana com *H. diminuta* pode ocorrer mediante ingestão do artrópode infetado, correspondendo ao hospedeiro intermediário (Baker, 2007; Bowman, 2014). As condições necessárias para a infeção, por ingestão do artrópode, fazem com que esta parasitose seja rara, contudo existem casos reportados, nomeadamente de uma criança de 5 anos em Espanha (Tena *et al.*, 1998; Newcomer & Fox, 2007).

#### **3.1.1.5. *Rodentolepis nana* (von Siebold, 1852)**

##### **3.1.1.5.1. Morfologia**

Os exemplares de *Rodentolepis nana* (= *Hymenolepis nana*), conhecida como a “ténia anã”, foram extraídos do conteúdo intestinal dos ratinhos parasitados. Estes exemplares mediram na sua maioria entre 4 a 5 mm de comprimento, podendo chegar aos 20 mm de comprimento, e 225 a 360  $\mu\text{m}$  de largura. Contudo, registos existentes na literatura atual descrevem que este céstode pode medir entre 15 e 40 mm de comprimento e 1 mm de largura (Baker, 2007; CDC, 2013). Foi demonstrado num estudo que as dimensões do parasita são afetadas quer pelo sistema imunitário do hospedeiro, quer pela temperatura a que este está exposto, sendo que, em animais imunodeprimidos estes céstodes apresentam, de uma forma geral, maiores dimensões, situação esta que ocorre igualmente em hospedeiros expostos a baixas temperaturas (Novak, Koschinsky, Smith & Evans, 1986). Por outro lado, a sobrepopulação que se pode verificar em infeções por céstodes (*crowding effect*) relaciona-se de forma inversa com as dimensões do parasita, apresentando estas dimensões menores com o aumento do número de céstodes presentes num mesmo hospedeiro – nanismo fisiológico (Read, 1951). O escólex deste parasita, com cerca de 155-195  $\mu\text{m}$  de largura (ao nível das ventosas), apresentava um pequeno rostelo provido de uma coroa de ganchos e 4 ventosas, podendo este estar evaginado ou invaginado (Figuras 13A e B respetivamente).

Figura 13 – Observação em MOC de espécimes de *Rodentolepis nana*.



A - escólex apresentando um rostelo armado evaginado; B - escólex apresentando um rostelo armado invaginado (cabeça de seta); C - estróbilo corado pelo Carmim Álcool Clorídrico; D - ovos de forma oval e com o embrião hexacanto no seu interior (originais).

Os proglótes grávidos são mais largos que compridos e os ovos, de forma elíptica, apresentavam em média 56,6 µm de comprimento e 42,2 µm de largura, e no seu interior observou-se o embrióforo, cujo comprimento foi em média de 27,6 µm e a largura de 22,8 µm, que por sua vez continha no seu interior o embrião hexacanto (Figura 13D). Nos dois pólos das oncosferas foi possível observar ligeiros espessamentos, a partir dos quais emergia um número limitado de filamentos.

À semelhança de alguns exemplares de *Brachylaima* sp. foi também realizada a técnica de Coloração de Tremátodes e Céstodes pelo Carmim Álcool Clorídrico na tentativa de otimizar a observação e identificação das estruturas internas do parasita (Figura 13C). Mas mais uma vez a premissa base desta coloração não foi possível e os parasitas sofreram retração dos tecidos durante o processo de coloração, inviabilizando medições das suas estruturas morfológicas para posterior comparação. A coloração em si não foi bem-sucedida, no entanto foi possível observar as estruturas internas em posição central (Figura 13C).

#### 3.1.1.5.2. Hospedeiros

O céstode *R. nana* caracteriza-se por ter um ciclo biológico heteroxeno, no qual mamíferos desempenham o papel de hospedeiros definitivos, e invertebrados o papel de hospedeiros intermediários (Tabela 5).

Tabela 5 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de *Rodentolepis nana*.

Hospedeiro Definitivo	Hospedeiro Intermediário Invertebrado
<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Primatas (incluindo o Homem);</li> <li>▪ Roedores (ratinhos [<i>Mus musculus</i>, <i>Mus spretus</i>], ratos e hamsters).</li> </ul>	<b>Artrópodes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Coleópteros (<i>Tenebrio molitor</i>, <i>Tenebrio obscurus</i>, <i>Tribolium confusum</i>);</li> <li>▪ Sifonâpteros (<i>Ctenocephalides canis</i>, <i>C. felis</i>, <i>Pulex irritans</i>, <i>Xenopsylla cheopis</i>).</li> </ul>
Referências: Afonso-Roque <i>et al.</i> (1984); Novak <i>et al.</i> (1986); Macnish, Ryan, Behnke & Thompson (2003); Baker (2007); Newcomer & Fox (2007); Pereira (2009); Roberts & Janovy (2009); Zajac & Conboy, (2012); Bowman (2014); Fuehrer (2014a); Fuehrer (2014b).	

### 3.1.1.5.3. Distribuição geográfica

Este parasita apresenta uma distribuição cosmopolita (Newcomer & Fox, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

### 3.1.1.5.4. Ciclo Biológico

O ciclo biológico deste parasita é exclusivo no mundo dos céstodes, sendo até ao momento o único céstode conhecido por poder realizar transmissão direta (Anexo J).

**Transmissão indireta:** Como é típico nos céstodes, este parasita apresenta um ciclo de vida heteroxeno, no qual os ovos são libertados nas fezes e ingeridos pelo hospedeiro intermediário artrópode, desenvolvendo-se de seguida a larva cisticercóide. O artrópode infetado é depois ingerido pelo hospedeiro definitivo havendo fixação da larva à mucosa intestinal e posterior desenvolvimento na forma adulta.

**Transmissão direta:** Contudo, a infeção do hospedeiro definitivo pode ocorrer mediante ingestão dos ovos libertados nas fezes e/ou presentes na água e/ou alimentos contaminados, sem recorrer a um hospedeiro intermediário – ciclo biológico monoxeno facultativo. Após ingestão do ovo a oncosfera eclode invadindo a mucosa intestinal do hospedeiro definitivo onde se desenvolve a larva cisticercóide entre 4 a 5 dias. Posteriormente, retorna ao lúmen intestinal e fixa-se à mucosa onde se desenvolve na forma adulta (10-11 dias).

**Autoinfeção:** Apesar de conseguir completar o seu ciclo biológico de modo heteroxeno ou monoxeno facultativo, como referido anteriormente, este céstode consegue ainda realizar autoinfeção, não precisando sair do hospedeiro definitivo para completar o seu ciclo de vida. Os ovos excretados no intestino libertam o embrião hexacanto que penetra nas vilosidades intestinais onde se desenvolve em larva cisticercóide e posteriormente na forma adulta (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn & Jennings, 1996; Baker, 2007; Newcomer & Fox, 2007; CDC, 2013; Bowman, 2014).

### 3.1.1.5.5. Potencial Zoonótico

Crompton (1999) refere que o céstode *R. nana* é responsável pela infeção de um elevado número de pessoas, que estimou ser cerca de 75 milhões de indivíduos a nível mundial.

Apesar de este céstode conseguir realizar 3 tipos de transmissão, a autoinfecção geralmente não ocorre em hospedeiros inicialmente infetados por transmissão direta, dada a imunidade produzida durante a fase tecidual da infecção original (Baker, 2007).

Foi recentemente reportado um caso clínico de um processo maligno com origem em *R. nana* num hospedeiro humano seropositivo para o Vírus da Imunodeficiência Humana. A infecção apresentava uma localização extraintestinal com proliferação de células neoplásicas que levaram à formação de metástases tumorais nos pulmões e linfonodos do paciente, características de um processo maligno. Este é o único caso de um processo tumoral maligno com origem num céstode num paciente humano descrito até ao momento (Muehlenbachs *et al.*, 2015).

#### **3.1.1.6. *Calodium hepaticum* (Bancroft, 1893) Moravec, 1982**

Os exemplares de *Calodium hepaticum* (= *Capillaria hepatica*) encontravam-se à superfície do fígado ou intrínsecos ao parênquima hepático, constituindo lesões leves ou de intensidade 1 (14,9%), lesões moderadas ou de intensidade 2 (14,9%) ou na sua maioria elevadas cargas parasitárias levando à classificação dos fígados com um grau de intensidade 3 correspondente a lesões graves (70,2%).

##### **3.1.1.6.1. Morfologia**

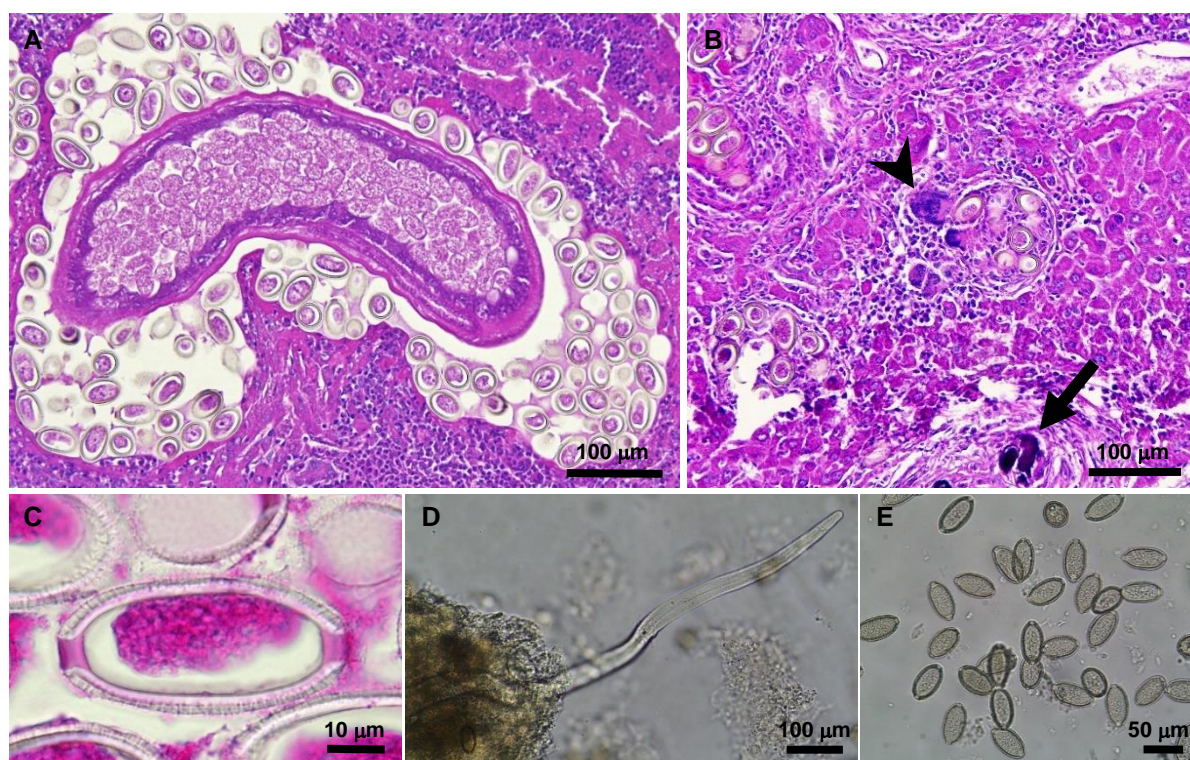
Os adultos de *C. hepaticum* observados apresentavam-se filiformes e com uma coloração esbranquiçada, tornando-se bastante difícil de os individualizar.

Foi possível medir a largura de alguns fragmentos de adultos obtidos nas raspagens, obtendo-se em média 157,5 µm para fêmeas grávidas e 124 µm para parasitas adultos sem ovos no seu interior. Encontra-se descrito na literatura que os machos medem entre 17 e 32 mm de comprimento e entre 40 e 80 µm de largura, enquanto que as fêmeas apresentam dimensões superiores, chegando aos 100 mm de comprimento e aos 200 µm de largura (Baker, 2007).

Foi ainda possível obter uma extremidade anterior, sendo que se observou uma abertura bucal muito reduzida e ausência de lábios. O esófago apresentava-se filiforme e comprido – tubo capilar (Figura 14D).

Os ovos destes capilarídeos apresentavam a forma de “barril” e possuíam dois opérculos, um em cada pólo (Figura 14C). O comprimento dos ovos era em média de 57,5 µm e a largura de cerca de 32 µm (Figuras 14C e E).

Figura 14 – Observação em MOC de cortes histológicos do fígado de *Mus musculus domesticus* e do produto de escarificação de um fígado positivo a *Calodium hepaticum*.



A - Fêmea adulta com ovos no seu interior, envolvida por tecido inflamatório. Reação inflamatória com presença de infiltrado de células mononucleadas; B - vários aglomerados de ovos envolvidos por reação inflamatória com infiltrado de células mononucleadas, células gigantes multinucleadas (cabeça de seta). Calcificação distrófica presente nalguns ovos (seta); C - corte histológico de um ovo apresentando forma de “barril”, dois opérculos e uma cápsula exterior estriada; D - extremidade anterior de um exemplar adulto; E - ovos presentes no produto de escarificação de um fígado positivo a *C. hepaticum* (originais).

São escassos os dados acerca da intensidade de infecção de *C. hepaticum* em populações de campo, por três razões principais: a) estes nemátodes adultos são compridos, muito finos e difíceis de isolar do seu curso tortuoso sem que estes se rompam, tornando a sua quantificação difícil; b) os adultos morrem geralmente após 60 dias da infecção inicial sendo gradualmente destruídos graças à resposta imunitária e reação inflamatória do hospedeiro; c) a contagem de ovos, apesar de possível, requer muita minúcia, tempo e ainda a homogeneização da totalidade do fígado, posterior digestão do homogeneizado, filtração através de um crivo de 150  $\mu\text{m}$  e contagem dos ovos com recurso a uma câmara de McMaster e MOC. Contudo, apesar da contagem de ovos ser possível, a correlação entre o número de ovos no fígado e o número de nemátodes adultos presente é ainda desconhecida (Spratt & Singleton, 2001).

### 3.1.1.6.1. Resultados Histopatológicos dos Fígados

Ao observar os cortes histológicos ao MOC foi possível identificar fêmeas adultas de *C. hepaticum* com numerosos ovos no seu interior, e envolvidas por tecido de inflamação caracterizado pela presença de um infiltrado de células mononucleadas (Figura 14A). Observaram-se também, aglomerados de ovos envolvidos por reação inflamatória, com infiltrado de células mononucleadas e células gigantes multinucleadas (Figura 14B). Alguns ovos apresentavam calcificação distrófica refletindo-se numa coloração roxo escuro dos mesmos. A observação do ovo em maior ampliação permitiu visualizar a típica forma de “barril”, os seus dois opérculos e a sua cápsula espessa exibindo uma aparência estriada (Figura 14C).

### 3.1.1.6.2. Hospedeiros

*C. hepaticum* é um nemátode com ciclo de vida monoxeno necessitando no entanto de hospedeiros de disseminação. Este parasita pode infectar várias espécies de animais domésticos, silvestres e selvagens, e o próprio Homem (Tabela 6). Os roedores, nomeadamente indivíduos da espécie *Rattus norvegicus*, estão descritos como sendo o principal hospedeiro reservatório deste nemátode (Resendes, Amaral, Rodrigues & Almeria, 2009; Correia *et al.*, 2011).

Tabela 6 – Espécies de hospedeiros definitivos de *Calodium hepaticum*.

Hospedeiro Definitivo
<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Artiodáctilos (<i>Antilocapra americana</i>, <i>Madoqua kirkii</i>, <i>Sus scrofa</i> e <i>Tayassu tajacu</i>);</li><li>▪ Carnívoros (<i>Canis aureus</i>, <i>C. familiaris</i>, <i>C. latrans</i>, <i>Cerdocyon thous</i>, <i>Felis catus</i>, <i>Lycalopex gymnocercus</i>, <i>Mustela</i> sp., <i>Procyon</i> sp., <i>Puma concolor</i>, <i>Spilogale putorius</i> e <i>Vulpes vulpes</i>);</li><li>▪ <i>Didelphidae</i>;</li><li>▪ Diprotodontes (<i>Bettongia penicillata</i>);</li><li>▪ Lagomorfos (<i>Lepus</i> sp., <i>Lepus europaeus</i> e <i>Oryctolagus cuniculus</i>);</li><li>▪ Perissodáctilos (<i>Equus caballus</i>);</li><li>▪ Primatas (<i>Ateles fusciceps</i>, <i>Cacajao rubicundus</i>, <i>Callithrix geoffroyi</i>, <i>C. jacchus</i>, <i>Cebus capucinus</i>, <i>Gorilla gorilla</i>, <i>G. beringei beringei</i>, <i>Lagothrix lagotricha</i>, <i>Lemur catta</i>, <i>Macaca fascicularis</i>, <i>M. mulatta</i>, <i>M. nigra</i>, <i>Pan troglodytes</i>, <i>Papio hamadryas</i>, <i>Pithecia pithecia</i>, <i>Presbytis entellus</i>, <i>Saguinus bicolor</i>, <i>Theropithecus gelada</i> e <i>Homo sapiens</i>);</li><li>▪ Roedores (<i>Actomys</i> spp., <i>Akodon</i> spp., <i>Apodemus flavicollis</i>, <i>A. sylvaticus</i>, <i>Arvicanthis</i> spp., <i>Arvicola terrestris scherman</i>, <i>Bandicota</i> spp., <i>Castor</i> spp., <i>Citellus</i> spp., <i>Clethrionomys gapperi</i>, <i>C. glareolus</i>, <i>Cricetomys</i> spp., <i>Cricetulus</i> spp., <i>Cynomys ludovicianus</i>, <i>Dasymys</i> spp., <i>Ellobius</i> spp., <i>Erethizon dorsatum</i>, <i>Geomys</i> spp., <i>Gerbillus</i> spp., <i>Hypogeomys antimena</i>, <i>Lemmus</i> spp., <i>Lemniscomys</i> spp., <i>Marmota monax</i>, <i>Microtus</i> spp., <i>M. guentheri</i>, <i>Mus musculus</i>, <i>Myodes</i> spp., <i>Myopotamus</i> spp., <i>Napeozapus</i> spp., <i>Neotoma</i> spp., <i>Niviventer fulvescens</i>, <i>Ondatra zibethicus</i>, <i>Otomys</i> spp., <i>Peromyscus maniculatus</i>, <i>Praomys albipes</i>, <i>Rattus confucianus</i>, <i>R. exulans</i>, <i>R. flavipectus</i>, <i>R. losea</i>, <i>R. norvegicus</i>, <i>R. rattus</i>, <i>R. tanezumi</i>, <i>Sciurus aestuan</i>, <i>S. vulgaris</i>, <i>Sigmodon</i> spp., <i>Synaptomys</i> spp., <i>Tamias striatus</i>, <i>Tatera</i> spp., e <i>Thomomys</i> spp.);</li><li>▪ Soricomorpha (<i>Neomys fodiens</i> e <i>Suncus murinus</i>);</li><li>▪ Quirópteros (<i>Cynopterus brachyotis</i>).</li></ul>
<b>Aves:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Passeriformes (<i>Corvus</i> spp.).</li></ul>
Referências: Afonso-Roque <i>et al.</i> (1984); Spratt & Singleton (2001); Redrobe & Patterson-Kane (2005); Baker (2007); Meerburg <i>et al.</i> (2009); Pereira (2009); Resendes <i>et al.</i> (2009); Correia <i>et al.</i> (2011); Crespo (2012); Fuehrer (2014a); Fuehrer (2014b).

#### **3.1.1.6.3. Distribuição geográfica**

Este parasita apresenta uma distribuição cosmopolita (Baker, 2007; Correia *et al.*, 2011; Fuehrer, 2014a; Fuehrer, 2014b).

#### **3.1.1.6.4. Ciclo Biológico**

A deposição dos ovos é realizada pelas fêmeas adultas no parênquima hepático sendo apenas libertados após predação/canibalismo/necrofagia do hospedeiro ou morte e decomposição deste no ambiente. Este nemátode é único na medida em que requer a morte do hospedeiro de forma a conseguir a libertação dos ovos e consequente disseminação. Ao ser ingerido por um hospedeiro de disseminação, o fígado infetado é assim digerido, promovendo a libertação dos ovos nas fezes e para o ambiente, altura em que pode ser detetado em eventuais técnicas coprológicas, embora este resultado não seja sinónimo de infeção. Os ovos tornam-se embrionados no ambiente, após 6 semanas de exposição ao ar. A infeção ocorre após ingestão dos ovos infetantes pelo hospedeiro definitivo. A eclosão dá-se no intestino onde a larva infetante penetra a mucosa intestinal chegando ao fígado via Sistema Porta, local onde atingem a maturidade após um período de cerca de 25 a 30 dias. Os machos desaparecem do fígado cerca de 33 dias após infeção deixando apenas as fêmeas grávidas (Spratt & Singleton, 2001; Baker, 2007; Resendes *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2011; Bowman, 2014) (Anexo K).

#### **3.1.1.6.5. Potencial Zoonótico**

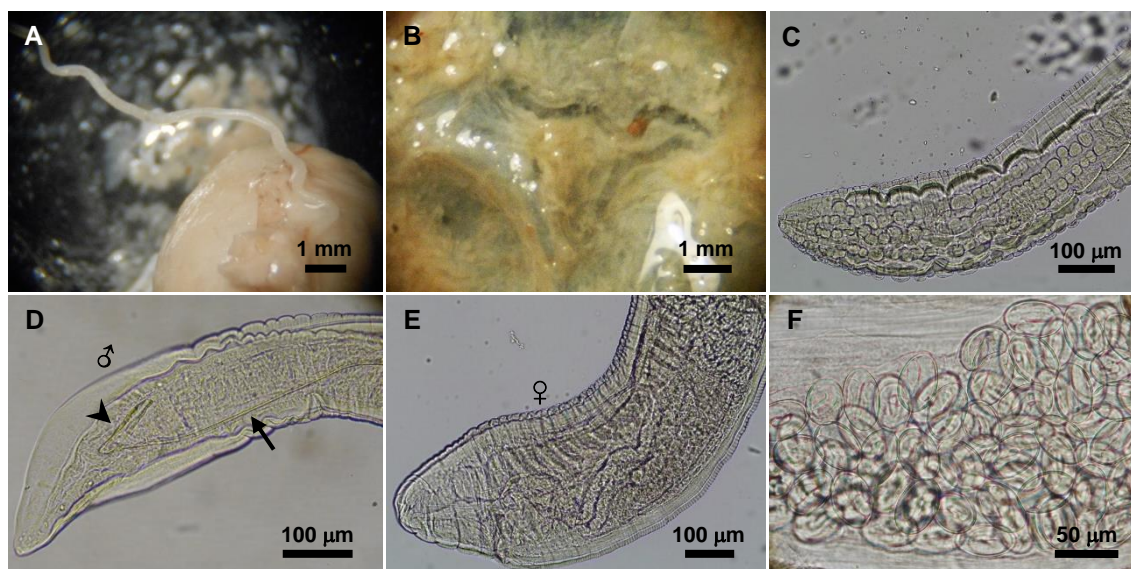
*C. hepaticum* é um nemátode de carácter zoonótico sendo que o Homem se infeta através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados, ou contato oral com o meio telúrico. Estão referidos na literatura cerca de 37 casos de infeção humana com *C. hepaticum*. Estes casos envolvem geralmente crianças entre 1 e 5 anos de idade, nomeadamente crianças em tenra idade e com contacto direto com o meio telúrico potencialmente contaminado, ou associado a hábitos de geofagia/pica (Juncker-Voss *et al.*, 2000; Baker, 2007; Resendes *et al.*, 2009). As infeções humanas são geralmente detetadas por análise histopatológica de cortes de fígado, com origem em biópsia (queixas do paciente) ou surpresa em exame *post mortem* (casos assintomáticos), circunstâncias que explicam a subestimativa de infeções humanas por este parasita. Foi reportado pela primeira vez no ano de 1979 a deteção de *C. hepaticum* em humanos com recurso à técnica de Imunofluorescência Indireta, mais tarde no ano de 2000 e mais recentemente em 2010, surgiram novos estudos com abordagem semelhante, o que abre portas para o futuro rastreio em larga escala da população em risco de infeção por este parasita (Galvão, 1979; Juncker-Voss *et al.*, 2000; Spratt & Singleton, 2001; Camargo *et al.* 2010).

### 3.1.1.7. *Gongylonema neoplasticum* Fibiger et Ditlevsen, 1914

#### 3.1.1.7.1. Morfologia

Os exemplares de *Gongylonema neoplasticum* foram extraídos da mucosa gástrica. O facto de se encontrarem fixos, em toda a sua extensão, à mucosa gástrica, tornou difícil a obtenção de exemplares completos (Figuras 15A e B).

Figura 15 – Observação em ME (A, B) e MOC (C, D, E, F) de espécimes de *Gongylonema neoplasticum*.



A - espécime adulto em processo de extração do estômago; B - sulco na mucosa gástrica resultante da fixação do parasita; C - extremidade anterior, pormenor dos espessamentos verruciformes ou bossas cuticulares; D - extremidade posterior de um macho, espícula maior (seta) e menor (cabeça de seta); E - extremidade posterior de uma fêmea; F - ovos de forma elíptica embrionados com a larva L1 no seu interior (originais).

A extremidade anterior apresentava-se coberta por espessamentos verruciformes ou bossas cuticulares características do género *Gongylonema* (Figura 15C). As fêmeas mediam cerca de 291 µm de largura (210-335 µm), enquanto os machos apresentavam dimensões menores, com cerca de 175 µm de largura. Os machos extraídos apresentaram ainda duas espículas na extremidade posterior, a maior com cerca de 450 µm de comprimento e a menor com cerca de 100 µm de comprimento (Figuras 15D e E). Segundo os autores Fibiger e Ditlevsen (1914) e Hitchcock e Bell (1952) as fêmeas de *G. neoplasticum* podem apresentar um comprimento de 25-80 mm e os machos de 10-17 mm. Os ovos de forma elíptica encontravam-se embrionados com a larva L1 ainda no interior da fêmea grávida e mediram em média 49,6 µm de comprimento e 32,1 µm de largura (Figura 15F).

#### 3.1.1.7.2. Hospedeiros

Este parasita apresenta um ciclo de vida heteroxeno, sendo o ratinho um dos hospedeiros definitivos e os escaravelhos e baratas os hospedeiros intermediários (Tabela 7).

Tabela 7 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de *Gongyлонema neoplasticum*.

Hospedeiro Definitivo	Hospedeiro Intermediário Invertebrado
<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Lagomorfo);</li> <li>▪ Roedores (<i>Apodemus</i> spp., <i>Apodemus sylvaticus</i>, <i>Dryomys</i> spp., <i>Meriones</i> spp., <i>Mus alexandrinus</i>, <i>M. decumanus</i>, <i>M. musculus</i>, <i>M. rattus</i>, <i>Rattus norvegicus</i>).</li> </ul>	<b>Artrópodes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Blatídeos (<i>Blattella germanica</i>, <i>Periplaneta americana</i>, <i>P. orientalis</i>);</li> <li>▪ <i>Tenebrio molitor</i> (Coleóptero).</li> </ul>
Referências: Afonso-Roque <i>et al.</i> (1984); Fibiger & Ditlevsen (1914); Hitchcock & Bell (1952); Anderson (2000); Eira, Miquel, Vingada & Torres (2006); Bowman (2014).	

### 3.1.1.7.3. Distribuição geográfica

Este parasita apresenta uma distribuição cosmopolita (Eira *et al.* 2006).

### 3.1.1.7.4. Ciclo Biológico

Os ovos de *G. neoplasticum* embrionados com a larva L1 no seu interior são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo. No ambiente, artrópodes coprófagos nomeadamente escaravelhos e baratas, ingerem os ovos ao alimentarem-se da matéria fecal. As larvas eclodem e desenvolvem-se inicialmente no hemocélio do inseto, ao atingirem o estágio de larva L3 a maioria encontra-se enquistada nos músculos, constituindo a larva infetante. O hospedeiro definitivo fica infetado após ingestão do artrópode coprófago (Hitchcock & Bell, 1952; Anderson, 2000; Eira *et al.* 2006).

### 3.1.1.7.5. Potencial Zoonótico

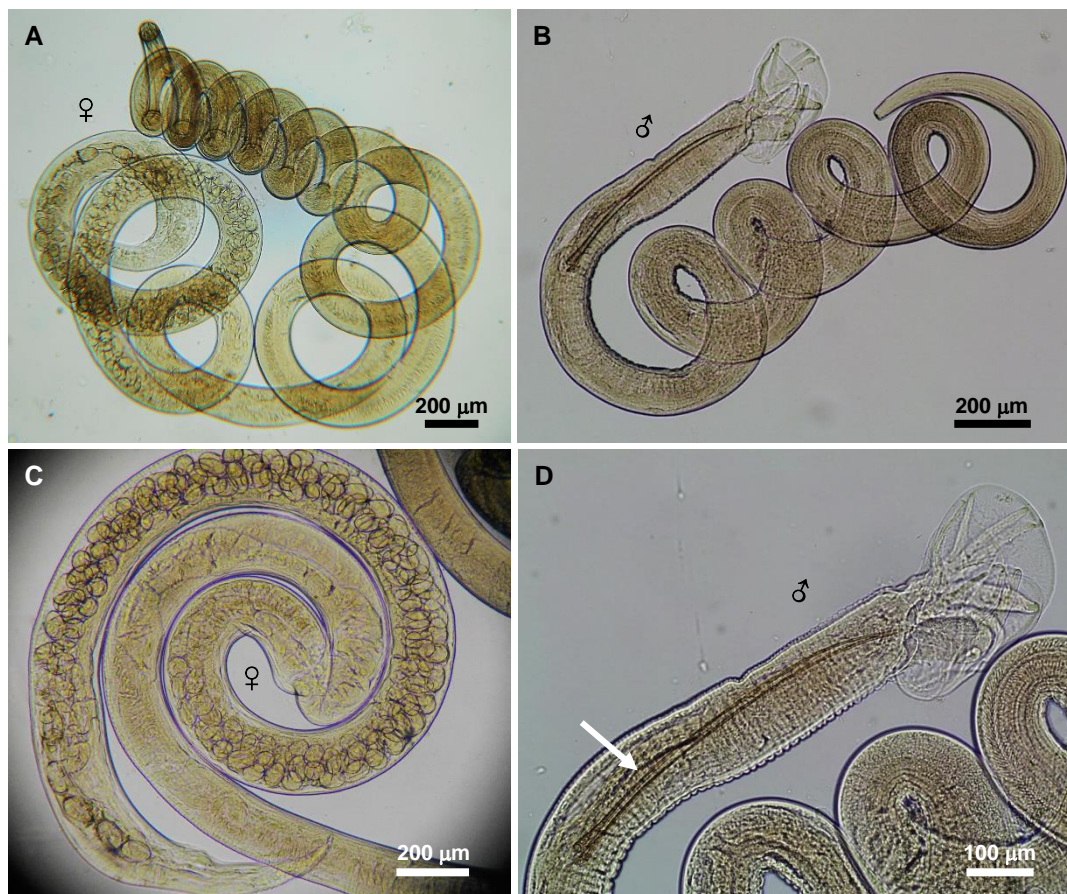
Apesar da existência de casos de infeção humana por *G. neoplasticum* ser desconhecida, existem vários registos de infeção humana por uma espécie do género *Gongyлонema*, muitas vezes denominado de *Gongyлонema pulchrum*. A infeção por este parasita localiza-se geralmente na cavidade oral e esófago e apesar de acidental parece ser uma parasitose subestimada uma vez que os sintomas se assemelham aos relatados em doenças como o Síndrome de Ekbom ou *Dilusional Parasitosis*. Alguns autores identificam o parasita descrito como *Gongyлонema* sp. ou como sendo *Gongyлонema pulchrum* por ser esta a espécie já descrita em humanos (Eberhard & Busillo, 1999; Wilde, Suankratay, Thongkam & Chaiyabutr, 2001; Wilson, Lorente, Allen & Eberhard, 2001; Ayala & Yencha, 2012). Uma vez que os ciclos de vida são muito semelhantes e os hospedeiros intermediários são os mesmos, o facto de descreverem o parasita em questão como *Gongyлонema* sp. e existir uma forte semelhança morfológica entre as espécies do género *Gongyлонema* pode significar uma subvalorização de *G. neoplasticum* como potencial espécie zoonótica. Para confirmar esta hipótese seriam necessários estudos adicionais, de preferência com recurso a biologia molecular, para distinguir estas duas espécies (Allen & Esquela-Kerscher, 2013).

### 3.1.1.8. *Heligmosomoides polygyrus* Dujardin, 1845

#### 3.1.1.8.1. Morfologia

Os exemplares dos tricostrongilídeos *Heligmosomoides polygyrus* (= *Nematospiroides dubius*) foram extraídos do conteúdo do intestino delgado. Os adultos apresentavam uma coloração desde esbranquiçada a avermelhada. Graças à rigidez em que se encontravam e ao estreito enrolamento em espiral (Figuras 16A e B), apenas foi possível medir o comprimento destes parasitas com recurso a um *software* de imagem (Adobe® Illustrator® CS6) (Figura 8). As fêmeas mediram na sua maioria cerca de 14,35 mm de comprimento enquanto os machos apresentavam valores na ordem de 5,9 mm. Está descrito na literatura que as fêmeas medem aproximadamente 9 a 12 mm de comprimento e os machos entre 4 e 6 mm de comprimento (Gregory, Montgomery & Montgomery, 1992; Baker, 2007). Já de largura, as fêmeas apresentavam uma média de 157,5 µm enquanto os machos possuíam cerca de 126 µm de largura. Os machos apresentavam uma bolsa copuladora bem desenvolvida e duas espículas filiformes na porção terminal do corpo que mediram em média 568 µm (Figura 16D). Os ovos apresentavam uma forma elíptica e mediam cerca de 75,5 µm de comprimento e 48,75 µm de largura (Figura 16C).

Figura 16 – Observação em MOC de espécimes de *Heligmosomoides polygyrus*.



A - fêmea adulta enrolada em espiral com ovos no seu interior; B - macho adulto enrolado em espiral; C - extremidade posterior de uma fêmea adulta grávida, ovos de forma elíptica no seu interior; D - extremidade posterior de um macho, espículas filiformes (seta) (originais).

### 3.1.1.8.2. Hospedeiros

O parasita *H. polygyrus* apresenta um ciclo biológico monoxeno sendo os roedores o seu hospedeiro definitivo (Tabela 8).

Tabela 8 – Espécies de hospedeiros definitivos de *Heligmosomoides polygyrus*.

Hospedeiro Definitivo
<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Roedores (<i>Apodemus</i> spp., <i>Apodemus flavicollis</i>, <i>A. sylvaticus</i>, <i>Clethrionomys</i> spp., <i>Mus musculus domesticus</i>, <i>Mus musculus musculus</i>, <i>Peromyscus maniculatus gambeli</i>, <i>Reithrodontomys megalotis</i>, <i>R. raviventri</i>).</li></ul>
Referências: Forrester (1971); Gregory <i>et al.</i> (1992); Monroy & Enriquez (1992); Anderson, 2000; Ferrari (2005); Baker (2007); Zajac & Conboy (2012).

### 3.1.1.8.3. Distribuição geográfica

Este parasita apresenta uma distribuição cosmopolita encontrando-se vastamente distribuído em roedores selvagens, em diversos países da América do Norte e Europa. É utilizado em larga escala como modelo experimental em imunologia parasitária e estudos de anti-helmínticos (Dunn, 1983; Monroy & Enriquez, 1992; Baker, 2007; Zajac & Conboy, 2012). Atualmente estão descritas 4 subespécies de *Heligmosomoides polygyrus* com base em características morfológicas: *H. p. polygyrus* de roedores selvagens do norte da Europa e *H. p. corsicus* de roedores selvagens do Mediterrâneo, *H. p. americanus* e *H. p. bakeri* de roedores selvagens da América do Norte (Durette-Desset, 1985; Ferrari, 2005).

### 3.1.1.8.4. Ciclo Biológico

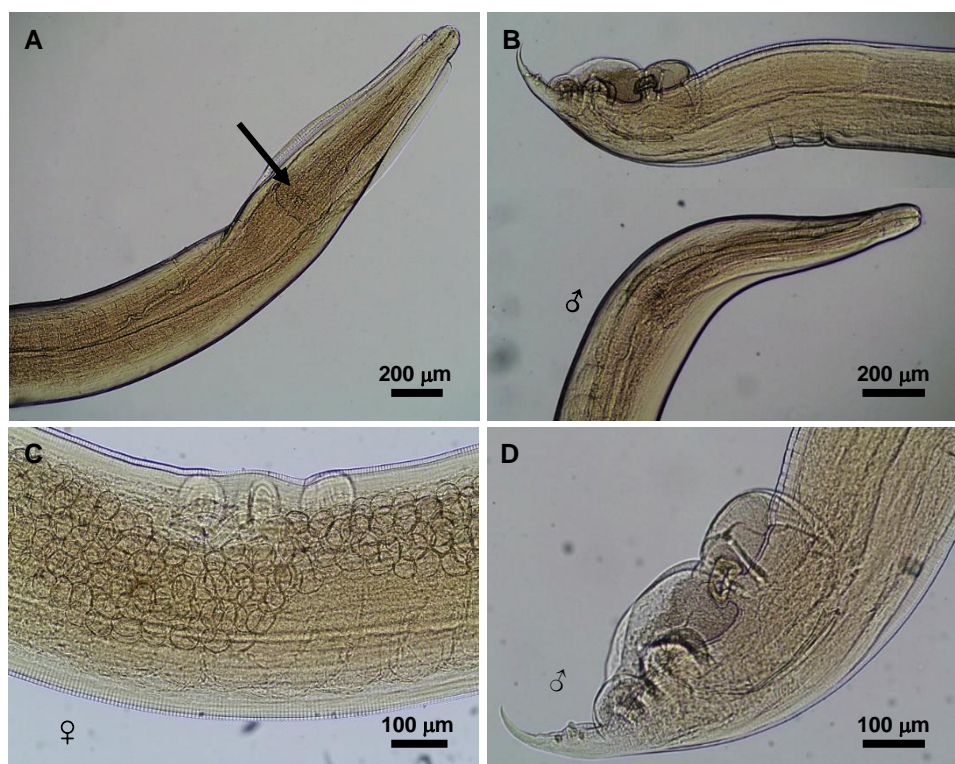
Os ovos são eliminados nas fezes para o meio ambiente e após cerca de 24 a 36 horas eclode a larva L1, que no período de 2 a 6 dias faz sucessivas mudas no ambiente até atingir o estágio L3, altura em que se torna infetante (Scott, 1987; Monroy & Enriquez, 1992; Anderson, 2000; Baker, 2007; Zajac & Conboy, 2012). O roedor fica infetado após ingestão das L3 presentes na água e/ou alimentos contaminados ou através da limpeza do pêlo contaminado (Hernandez & Sukhdeo, 1995; Ferrari, 2005), que penetram a mucosa intestinal onde fazem a muda para L4 em cerca de 1 semana, findo esse período retornam ao lúmen intestinal. Cerca de 9 a 11 dias após infeção do hospedeiro atingem o estado adulto, sendo a sua alimentação maioritariamente histófaga (mucosa intestinal) (Monroy & Enriquez, 1992; Bansemir & Sukhdeo, 1994). Os adultos de *H. polygyrus* podem viver até 3 meses dependendo da subespécie em questão e do sistema imunitário do hospedeiro (Ferrari, 2005) (Anexo L).

### 3.1.1.9. *Heterakis spumosa* Schneider, 1866

#### 3.1.1.9.1. Morfologia

Os exemplares de *Heterakis spumosa* foram extraídos do intestino grosso, nomeadamente no cego e porção inicial do cólon, dos ratinhos com estes parasitas. Os adultos de *H. spumosa* apresentavam coloração esbranquiçada, 3 pequenos lábios na cavidade bucal e um esófago cilíndrico e comprido com cerca de 856,7  $\mu\text{m}$  de comprimento, terminando num bolbo distinto com uma estrutura em forma de “Y” no seu interior. Apresentavam 2 asas cervicais laterais na porção anterior do corpo (Figura 17A).

Figura 17 – Observação em MOC de espécimes de *Heterakis spumosa*.



A - extremidade anterior, pormenor do bolbo esofágico em “Y” (seta); B - macho adulto, extremidade posterior (em cima) e extremidade anterior (em baixo); C - fêmea adulta, vulva com processos cuticulares; D - extremidade posterior de um macho, ventosa genital pré-cloacal (originalis).

Os machos mediram em média 8,43 mm de comprimento e 365  $\mu\text{m}$  de largura (Figura 17B). Estes não apresentavam gubernáculo mas sim uma ventosa genital pré-cloacal na porção caudal (Figura 17D), contendo 10 papilas caudais (2 pares de papilas pedunculadas ao nível da ventosa, 3 pares de papilas pedunculadas laterais que suportam as asas caudais, 2 pares de papilas sésseis próximas da cloaca e 3 pares de papilas laterais na ponta da cauda) e 2 espículas em ligeira curvatura (Anexo H).

As fêmeas mediram em média 11,65 mm de comprimento e 307,5  $\mu\text{m}$  de largura. Os ovos mediram aproximadamente 59,2  $\mu\text{m}$  de comprimento e 40  $\mu\text{m}$  de largura (Figura 17C).

### 3.1.1.9.2. Hospedeiros

O parasita *H. spumosa* apresenta um ciclo biológico monoxeno, sendo os roedores os seus hospedeiros definitivos (Tabela 9).

Tabela 9 – Espécies de hospedeiros definitivos de *Heterakis spumosa*.

Hospedeiro Definitivo
<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Roedores (<i>Apodemus</i> spp., <i>Apodemus argenteus</i>, <i>A. speciosus</i>, <i>Bandicota beganlensis</i>, <i>Cricetomys gambianus</i>, <i>Hydromys chrysogaster</i>, <i>Mus musculus</i>, <i>Rattus fuscipes</i>, <i>R. lutreolus</i>, <i>R. norvegicus</i>, <i>R. rattus</i>, <i>R. sordidus</i>, <i>R. tunneyi</i>);</li><li>▪ Soricomorpha (<i>Mogera</i> spp.).</li></ul>
Referências: Afonso-Roque <i>et al.</i> (1984); Afonso-Roque, M.M. (1989); Anderson, 2000; Ito & Itagaki (2003); Baker (2007); Robles, Navone & Villafañe (2008); Pereira (2009); Roberts & Janovy (2009); Crespo (2012); Zajac & Conboy (2012).

### 3.1.1.9.3. Distribuição geográfica

Este parasita apresenta uma distribuição cosmopolita (Baker, 2007; Roberts & Janovy, 2009; Zajac & Conboy, 2012).

### 3.1.1.9.4. Ciclo Biológico

Os ovos de *H. spumosa* são libertados nas fezes e ficam embrionados passadas 2 semanas no ambiente, tornando-se infetantes. Aquando da ingestão dos ovos infetantes pelo roedor, estes eclodem no estômago e a larvas resultantes migram para o cego e cólon onde atingem o estado adulto entre 26 a 47 dias depois (Baker, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

### 3.1.1.10. *Mastophorus muris* Gmelin, 1790

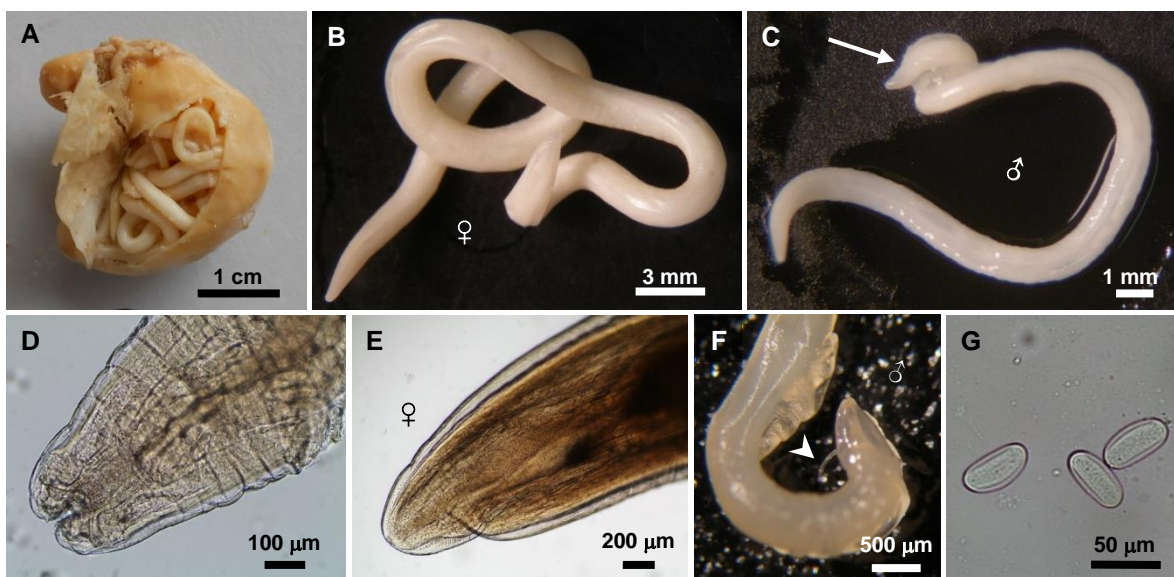
#### 3.1.1.10.1. Morfologia

Os exemplares de *Mastophorus muris* foram extraídos maioritariamente do conteúdo gástrico, formando muitas vezes extensos “novelos” de parasitas (Figura 18A), em certos casos a carga parasitária verificou-se tão elevada que alguns indivíduos se encontravam já ao nível do intestino delgado, nomeadamente no duodeno. Estes parasitas apresentavam uma coloração esbranquiçada a amarelada.

Os machos adultos mediam em média cerca de 23,3 mm de comprimento (11-31 mm) e 826 µm de largura enquanto as fêmeas mediam cerca de 37,4 mm de comprimento (12-71 mm) e entre 1 e 2 mm de largura (Figuras 18B e D). Ao contrário do que se verificou nas fêmeas (Figura 18E), os machos apresentavam a extremidade posterior enrolada em espiral e uma espícula na zona terminal (Figura 18C e F).

Os ovos apresentavam-se com formato ovoide e embrionados com a larva L1 no seu interior e mediam aproximadamente 55,25 µm de comprimento e 30 µm de largura (Figura 18G).

Figura 18 – Observação a olho nu (A), em ME (B, C, F) e MOC (D, E, G) de espécimes de *Mastophorus muris*.



A - Estômago repleto de parasitas adultos no seu interior; B - fêmea adulta; C - macho adulto, extremidade posterior enrolada (seta); D - extremidade anterior; E - extremidade posterior de uma fêmea; F - extremidade posterior de um macho, pormenor da espícula (cabeça de seta); G - ovos de formato ovoide embrionados, obtidos após maceração de um espécime fêmea (originais).

### 3.1.1.10.2. Hospedeiros

O parasita *M. muris* apresenta um ciclo biológico heteroxeno sendo os roedores os hospedeiros definitivos e os invertebrados, em particular insetos, os hospedeiros intermediários (Tabela 10).

Tabela 10 – Espécies de hospedeiros definitivos e intermediários de *Mastophorus muris*.

Hospedeiro Definitivo	Hospedeiro Intermediário Invertebrado
<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Roedores (<i>Apodemus sylvaticus</i>, <i>Calomys callosus</i>, <i>Clethrionomys glareolus</i>, <i>Mus musculus</i>, <i>Rattus alexandrinus</i>, <i>R. assimilis</i>, <i>R. norvegicus</i>, <i>R. rattus</i>, <i>Sigmodon hispidus</i>).</li> </ul>	<b>Artrópodes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Tenebrio molitor</i> (Coleóptero);</li> <li>▪ <i>Blattella germanica</i> (Blatídeo);</li> <li>▪ Dípteros (<i>Phlebotomus ariasi</i>, <i>P. perniciosus</i>);</li> <li>▪ Sifonápteros (<i>Ceratophyllus anisus</i>, <i>Ctenophthalmus arvenus</i>, <i>C. agyrtes</i>, <i>Ctenopsyllus segnis</i>, <i>Nopsyllus fasciatus</i>, <i>Xenopsylla cheopis</i>).</li> </ul>
Referências: Afonso-Roque, M.M. (1989); Anderson (2000); Pereira (2009); Rose & Bellows (2014).	

### 3.1.1.10.3. Distribuição geográfica

Este parasita apresenta uma distribuição cosmopolita (Afonso-Roque, 1989).

### 3.1.1.10.4. Ciclo Biológico

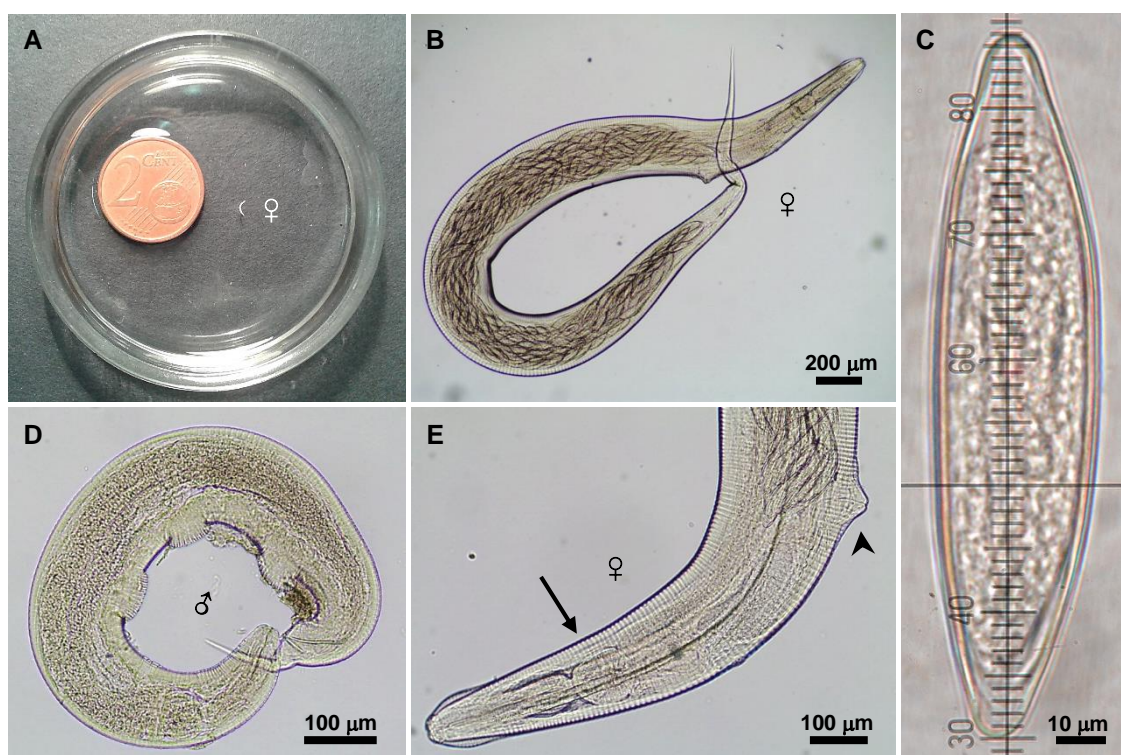
Os ovos são libertados nas fezes sendo ingeridos pelos hospedeiros intermediários. As larvas L1 eclodem e invadem os tecidos do artrópode onde encapsulam e se desenvolvem até larva L3. Os roedores infetam-se após ingestão do artrópode infetado (Anderson, 2000).

### 3.1.1.11. *Syphacia obvelata* Rudolphi, 1802

#### 3.1.1.11.1. Morfologia

Os exemplares de *Syphacia obvelata* foram extraídos do cego dos ratinhos analisados. Estes apresentavam uma coloração esbranquiçada e por vezes com tons amarelados e/ou acastanhados (Figura 19A). Na extremidade anterior apresentavam 3 lábios simples e 2 pequenas asas cervicais laterais (Figura 19E). O esôfago é do tipo oxiurídeo, terminando num bolbo esofágico bem desenvolvido e praticamente esférico. Os parasitas adultos apresentavam dimorfismo sexual considerável uma vez que as fêmeas possuíam um comprimento quatro vezes superior ao dos machos. Estes últimos apresentavam um comprimento médio de 1 mm e 147,5 µm de largura e encontravam-se fortemente enrolados apresentando 3 dilatações cuticulares mamilonadas na superfície ventral do corpo (Figura 19D). Na extremidade posterior apresentavam um pequeno gubernáculo e uma espícula proeminente (Figura 19D).

Figura 19 – Observação a olho nu (A) e MOC (B, C, D, E) de espécimes de *Syphacia obvelata*.



A - fêmea adulta; B - fêmea adulta grávida; C - ovo de forma assimétrica, lembrando o formato de uma “banana”; D - macho apresentando 3 dilatações cuticulares mamilonadas na superfície ventral do corpo e um pequeno gubernáculo com uma espícula proeminente; E - extremidade anterior de uma fêmea, pequenas asas cervicais, bulbo esofágico praticamente esférico (seta) e abertura vulvar (cabeça de seta) (originais).

As fêmeas apresentavam-se esticadas ou ligeiramente encurvadas e mediram aproximadamente 4 mm de comprimento (3250-5000 µm) e 273 µm de largura (Figura 19B). Na extremidade anterior apresentavam a vulva ao nível do bulbo esofágico e a extremidade

posterior terminava numa estrutura afilada. Tais características contribuíram para a sua denominação habitual de *pinworms* – nemátodes em forma de “alfinete”.

Os ovos apresentavam-se assimétricos, achatados de um dos lados, lembrando o formato de uma “banana” e mediram aproximadamente 137,1 µm de comprimento e 41,1 µm de largura (Figura 19C).

### 3.1.1.11.2. Hospedeiros

O parasita *S. obvelata* apresenta um ciclo biológico monoxeno sendo os roedores os hospedeiros definitivos (Tabela 11).

Tabela 11 – Espécies de hospedeiros definitivos de *Syphacia obvelata*.

Hospedeiro Definitivo
<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Primatas (incluindo <i>Homo sapiens</i>);</li><li>▪ Roedores (<i>Bandicota bengalensis</i>, Cricetidae, <i>Cricetomys gambianus</i>, Gerbillinae, <i>Hydromys chrysogaster</i>, <i>Mus musculus</i>, <i>M. spretus</i>, <i>Praomys coucha</i>, <i>Rattus fuscipes</i>, <i>R. lutreolus</i>, <i>R. norvegicus</i>, <i>R. rattus</i>, <i>R. sordidus</i>, <i>R. tunneyi</i>).</li></ul>
Referências: Afonso-Roque, M.M. (1989); Anderson (2000); Baker (2007); Robles <i>et al.</i> (2008); Pereira (2009); Roberts & Janovy (2009); Crespo (2012); Zajac & Conboy (2012).

### 3.1.1.11.3. Distribuição geográfica

Este parasita apresenta uma distribuição cosmopolita (Afonso-Roque, 1989; Zajac & Conboy, 2012).

### 3.1.1.11.4. Ciclo Biológico

A fêmea deposita os ovos na região perianal, local onde se tornam embrionados após algumas horas. A infecção dá-se através da ingestão de ovos com larvas L3 fixados à região perianal, no ambiente ou na água e/ou alimentos contaminados, sendo o período pré-patente de 11 a 15 dias (Anderson, 2000; Baker, 2007). Uma vez no sistema digestivo, as larvas eclodem a partir dos ovos e migram para o cego e cólon onde realizam mais 4 mudas até ao estágio adulto. Após a cópula os machos morrem e são eliminados pelas fezes, ficando as fêmeas grávidas no cego e cólon. Estas migram posteriormente para a região perianal onde depositam os ovos, sofrem dessecação e morrem (Zenner, 1998). O fenómeno de retroinfecção também pode ocorrer, caracterizando-se pela eclosão das larvas na zona perianal e sucessiva migração do ânus para o cólon e cego (Taffs, 1976; MacArthur & Wood, 1978; Baker, 2007). Outra forma de infecção é a inalação e sucessiva deglutição dos ovos, uma vez que estes apresentam um baixo peso molecular podendo constituir aerossóis (MacArthur & Wood, 1978; Baker, 2007).

### 3.1.1.11.5. Potencial Zoonótico

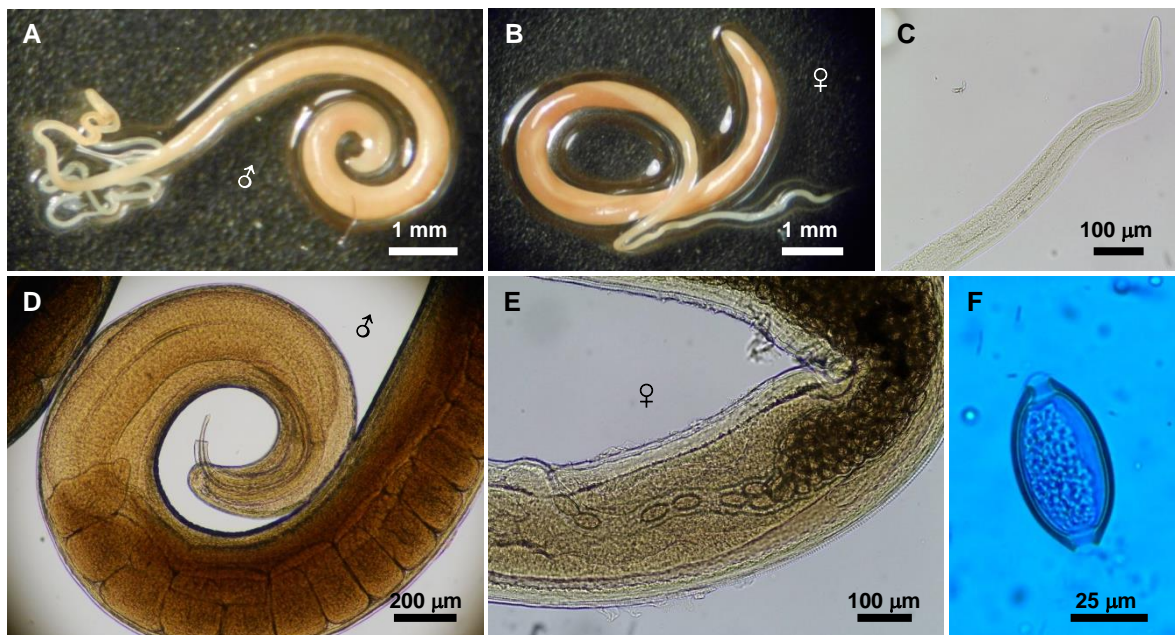
Apesar de raras, as infecções humanas por *S. obvelata* podem ocorrer, sendo fundamentais as boas práticas de higiene aquando da manipulação de animais com infecção por este nemátode (quer domésticos, quer selvagens) e o uso de máscara de forma a evitar a infeção por aerossóis com os seus ovos (Baker, 2007; Newcomer & Fox, 2007).

### 3.1.1.12. *Trichuris muris* Schrank, 1788

#### 3.1.1.12.1. Morfologia

Os exemplares de *Trichuris muris* foram extraídos ao nível do intestino grosso, nomeadamente do cego e porção inicial do cólon, encontrando-se a maioria dos exemplares fixados pela extremidade anterior à mucosa do órgão. Apresentavam uma coloração esbranquiçada e por vezes amarelada ou mesmo acastanhada (Figuras 20A e B). A extremidade anterior apresentava-se filiforme e fina constituindo o esticossoma, enquanto a extremidade posterior é mais larga e geralmente espiralada no caso dos machos (Figuras 20A, C e D). Tais características permitiram que fossem denominados de *whipworms* – nemátodes em forma de “chicote”.

Figura 20 – Observação ao ME (A, B) e MOC (C, D, E, F) de espécimes de *Trichuris muris*.



A - Macho adulto, extremidade posterior (mais larga) enrolada em espiral; B - fêmea adulta; C - extremidade anterior filiforme; D - macho, extremidade posterior, pormenor da bolsa espicular e espícula; E - fêmea, fila de ovos na zona de terminação do órgão reprodutor; F - ovo bioperculado em forma de “limão” com 2 tampões proeminentes, produto da técnica de sedimentação natural com Azul de Metileno (originais).

Os ovos apresentavam-se, à semelhança dos ovos de *C. hepaticum*, bioperculados com dois tampões proeminentes e lembrando a forma de um “limão” e mediram aproximadamente 62 µm de comprimento e 32 µm de largura (Figuras 20E e F).

### 3.1.1.12.2. Hospedeiros

O parasita *T. muris* apresenta um ciclo biológico monoxeno sendo os roedores os hospedeiros definitivos (Tabela 12).

Tabela 12 – Espécies de hospedeiros definitivos de *Trichuris muris*.

Hospedeiro Definitivo
<b>Mamíferos:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Roedores (Arvicolidae, <i>Arvicanthis</i> spp., Bathyergidae, Cricetidae, <i>Citellus</i> spp., <i>Cricetulus</i> spp., Echimyidae, <i>Echinomys</i> spp., <i>Epimys</i> spp., <i>Georychus</i> spp., <i>Holochilus</i> spp., Hystrichidae, <i>Loncheres</i> spp., <i>Meriones</i> spp., <i>Mesocricetus</i> spp., <i>Microtus</i> spp., Muridae, <i>Mus</i> spp., <i>Mus musculus</i>, <i>Opodemus</i> spp., <i>Rattus</i> spp., <i>Rattus norvegicus</i>, <i>R. rattus</i>, Sciuridae, <i>Trychomys</i> spp.).</li></ul>
Referências: Lee & Wright (1978); Afonso-Roque (1989); Anderson (2000); Baker (2007); Pereira (2009); Crespo (2012).

### 3.1.1.12.3. Distribuição geográfica

Este parasita apresenta uma distribuição cosmopolita (Robles & Navone, 2014).

### 3.1.1.12.4. Ciclo Biológico

Os ovos são eliminados nas fezes do roedor tornando-se embrionados no ambiente após um período de cerca de 2 meses. Após a ingestão dos ovos pelo roedor, as larvas L1 infetantes eclodem e migram para a mucosa cecal e cólica onde penetram o epitélio e realizam as sucessivas mudas para L2 (9 a 11 dias pós-infeção), L3 (17 dias pós-infeção) e L4 (22 a 28 dias pós-infeção) até ao estágio adulto (29 a 32 dias pós-infeção) (Baker, 2007; Klementowics, Travis & Grecis, 2012; Hurst & Else, 2013). Ao contrário de outros nemátodes que se encontram livres no lúmen dos órgãos, os adultos de *T. muris* mantêm-se em íntima associação com a mucosa cecal e cólica (Panesar & Croll, 1980). O nemátode adulto induz a formação de um sincício, com origem nos enterócitos, usando para isso a extremidade anterior, alimentando-se da mucosa epitelial. Posteriormente inicia a extensão do sincício originando túneis sinuosos à superfície da mucosa do cego e cólon (Lee & Wright, 1978). Na segunda semana após o início da produção de ovos cada fêmea produz entre 4000 a 5000 ovos por dia, atingindo um máximo de 7500 a 7900 por dia durante a terceira e quinta semana, a partir da qual a produção de ovos diminui significativamente (Olsen, 1986).

### 3.1.2. Composição quantitativa da Helmintofauna gastrointestinal e hepática de *Mus musculus domesticus* no Arquipélago da Madeira

Dos 200 ratinhos analisados, 182 (91,0%) encontravam-se parasitados com pelo menos uma espécie de parasita, sendo que destes 144 pertenciam à ilha da Madeira (n = 161) e 38 à ilha de Porto Santo (n = 39). Após realização do Teste Exato de Fisher, foi possível verificar que a diferença de prevalências entre as ilhas (89,4% para a Madeira e 97,4% para Porto Santo) não era estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 21 e Tabela 13).

Como referido anteriormente, foram identificadas 12 espécies de parasitas formadas por tremátodes da espécie *Brachylaima* sp., céstodes das espécies *Cysticercus fasciolaris* (forma larvar de *Taenia taeniaeformis*), *Cysticercus* sp. (forma larvar de *Taenia* sp.), *Hymenolepis diminuta*, *Rodentolepis nana* e nemátodes das espécies *Calodium hepaticum*, *Gongylonema neoplasticum*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Heterakis spumosa*, *Mastophorus muris*, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*. A composição qualitativa das duas ilhas difere na medida em que todos os parasitas, com exceção de *Gongylonema neoplasticum*, foram identificados na ilha da Madeira, enquanto *Brachylaima* sp., *Cysticercus fasciolaris*, *Cysticercus* sp., *Gongylonema neoplasticum*, *Mastophorus muris* e *Syphacia obvelata* foram as únicas espécies identificadas em Porto Santo (Figura 21).

Relativamente às espécies de parasitas encontradas, os nemátodes *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris* são os que apresentam prevalências amostrais mais elevadas, respetivamente 73,5% e 39,0% para o Arquipélago. De referir que *Syphacia obvelata* foi identificada nas duas ilhas sendo o parasita com maior prevalência em ambas (68,9% para a Madeira e 92,3% para Porto Santo), enquanto *Trichuris muris* foi identificado apenas na ilha da Madeira com uma prevalência de 48,4% (Figura 21 e Tabela 13).

Figura 21 – Helmintofauna gastrointestinal e hepática presente no Arquipélago da Madeira, ilha da Madeira e ilha de Porto Santo por número de animais positivos.

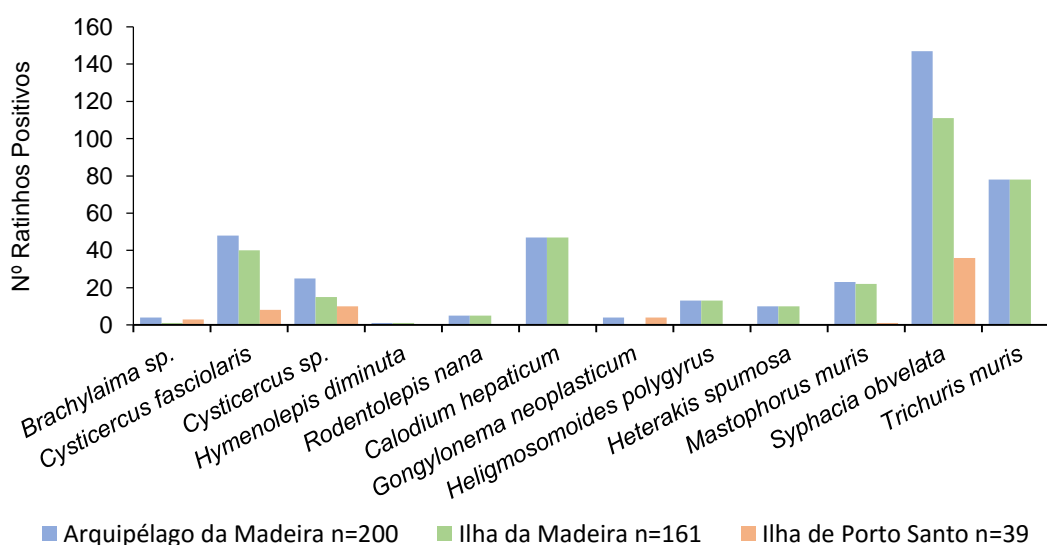


Tabela 13 – Helmintofauna gastrointestinal e hepática de *Mus musculus domesticus* no Arquipélago da Madeira, ilha da Madeira e ilha de Porto Santo com informação da localização no hospedeiro, prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades.

Espécie	Localização Hospedeiro	Arquipélago da Madeira n=200					Ilha da Madeira n=161					Ilha de Porto Santo n=39				
		Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.
<b>TREMÁTODES</b>		<b>4</b>	<b>2,0</b>	<b>0,8-5,0</b>	–	–	<b>1</b>	<b>0,6</b>	<b>0,1-3,4</b>	–	–	<b>3</b>	<b>7,7</b>	<b>2,7-20,3</b>	–	–
<i>Brachylaima</i> sp.	I.D.	4	2,0	0,8-5,0	12,5	(1-27)	1	0,6	0,1-3,4	1,0	(1)	3	7,7	2,7-20,3	16,3	(8-27)
<b>CÉSTODES</b>		<b>75</b>	<b>37,5</b>	<b>31,1-44,4</b>	–	–	<b>57</b>	<b>35,4</b>	<b>28,4-43,1</b>	–	–	<b>18</b>	<b>46,2</b>	<b>31,6-61,4</b>	–	–
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	Fígado	48	24,0	18,6-30,4	1,3	(1-5)	40	24,8	18,8-32,1	1,4	(1-5)	8	20,5	10,8-35,5	1,1	(1-2)
<i>Cysticercus</i> sp.	Fígado	25	12,5	8,6-17,8	1,3	(1-4)	15	9,3	5,7-14,8	1,5	(1-4)	10	25,6	14,6-41,1	1,1	(1-2)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	I.D.	1	0,5	0,1-2,8	1,0	(1)	1	0,6	0,1-3,4	1,0	1					
<i>Rodentolepis nana</i>	I.D.	5	2,5	1,1-5,7	∅	∅	5	3,1	1,3-7,1	∅	∅					
<b>NEMÁTODES</b>		<b>176</b>	<b>88,0</b>	<b>82,8-91,8</b>	–	–	<b>140</b>	<b>87,0</b>	<b>80,9-91,3</b>	–	–	<b>36</b>	<b>92,3</b>	<b>79,7-97,3</b>	–	–
<i>Calodium hepaticum</i>	Fígado	47	23,5	18,2-29,8	2,6	(1-3)	47	29,2	22,7-36,6	2,6	(1-3)					
<i>Gongylonema neoplasticum</i>	Estômago	4	2,0	0,8-5,0	1,8	(1-3)						4	10,3	4,1-23,6	1,8	(1-3)
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	I.D.	13	6,5	3,8-10,8	37,7	(2-97)	13	8,1	4,2-13,3	37,7	(2-93)					
<i>Heterakis spumosa</i>	I.G.	10	5,0	2,7-9,0	1,2	(1-2)	10	6,2	3,4-11,1	1,2	(1-20)					
<i>Mastophorus muris</i>	Estômago	23	11,5	7,8-16,7	6,3	(1-57)	22	13,7	9,2-19,8	6,5	(1-57)	1	2,6	0,5-13,2	1,0	(1)
<i>Syphacia obvelata</i>	I.G.	147	73,5	67,0-79,1	24,8	(1-146)	111	68,9	61,4-75,6	23,6	(1-134)	36	92,3	79,7-97,3	28,4	(1-146)
<i>Trichuris muris</i>	I.G.	78	39,0	32,5-45,9	7,1	(1-48)	78	48,4	40,9-56,1	7,1	(1-48)					
<b>Total parasitados</b>	–	<b>182</b>	<b>91,0</b>	<b>86,2-94,2</b>	–	–	<b>144</b>	<b>89,4</b>	<b>83,7-93,3</b>	–	–	<b>38</b>	<b>97,4</b>	<b>86,8-99,5</b>	–	–

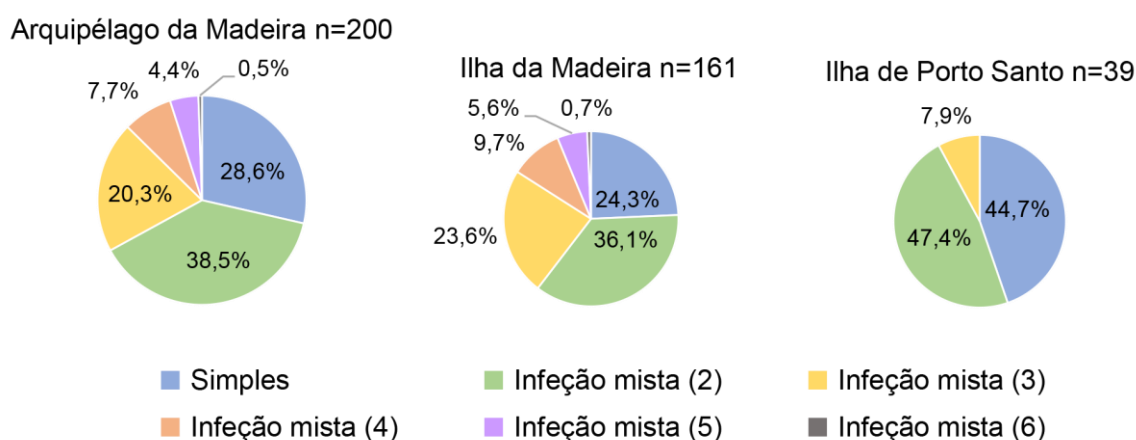
Pos.: Positivos; Prev.: Prevalência; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; I.M.: Intensidade Média; A. I.: Amplitude de Intensidades. “–” Não se aplica; “∅” ausência de dados por fragmentação dos exemplares; células a cinzento: parasitas não identificados nesses locais.

No que respeita ao tipo de infeção, e tendo em conta o total de ratinhos parasitados, verificou-se que 28,6% dos animais do Arquipélago da Madeira apresentavam infeções simples, enquanto 71,4% possuíam infeções mistas (com 2 a 6 espécies de parasitas). No caso particular de cada ilha, verificou-se que a ilha da Madeira mantinha esta tendência, apresentando 24,3% dos animais com infeção simples e 75,7% dos animais com infeção mista. Já na ilha de Porto Santo, 44,7% dos animais apresentavam infeções simples enquanto os restantes 55,3% apresentavam infeções mistas. Adicionalmente, verificou-se que ao contrário da ilha da Madeira, que apresentou infeções mistas até 6 espécies de parasitas diferentes, na ilha de Porto Santo as infeções mistas atingiam um máximo de 3 espécies parasitas diferentes (Tabela 14 e Figura 22).

Tabela 14 – Tipos de infeções observadas em *Mus musculus domesticus* no total de ratinhos positivos no Arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

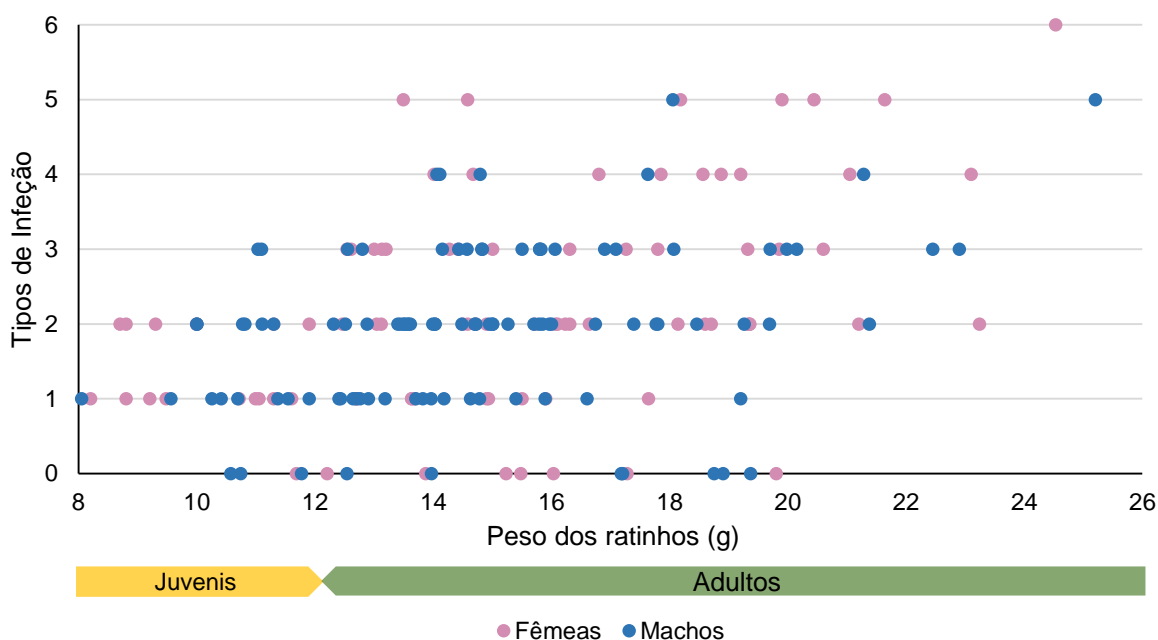
Tipo de infeção	Arquipélago da Madeira n=200		Ilha da Madeira n=161		Ilha de Porto Santo n=39	
	n	%	n	%	n	%
Simple	52	28,6	35	24,3	17	44,7
Infeção mista (2)	70	38,5	52	36,1	18	47,4
Infeção mista (3)	37	20,3	34	23,6	3	7,9
Infeção mista (4)	14	7,7	14	9,7	0	0,0
Infeção mista (5)	8	4,4	8	5,6	0	0,0
Infeção mista (6)	1	0,5	1	0,7	0	0,0
<b>Total infeções mistas</b>	<b>130</b>	<b>71,4</b>	<b>109</b>	<b>75,7</b>	<b>21</b>	<b>55,3</b>
<b>Total Parasitados</b>	<b>182</b>	<b>91,0</b>	<b>144</b>	<b>89,4</b>	<b>38</b>	<b>97,4</b>

Figura 22 – Tipos de infeções observadas em *Mus musculus domesticus* no total de ratinhos positivos no Arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.



Numa primeira análise dos dados referentes ao sexo, tipo de infeção, peso e idade dos animais analisados (Figura 23), não se verificou uma tendência ou associação óbvias entre estes fatores, contudo foi possível observar que os adultos apresentavam infeções mistas com um maior número de espécies relativamente aos animais juvenis.

Figura 23 – Distribuição dos ratinhos em função do sexo, peso, idade e tipo de infeção no Arquipélago da Madeira (n=188).



Tipos de Infeção: 0 = ausência de infeção; 1 = infeção simples; 2 = infeção mista com 2 espécies parasitas; 3 = infeção mista com 3 espécies parasitas; 4 = infeção mista com 4 espécies parasitas; 5 = infeção mista com 5 espécies parasitas e 6 = infeção mista com 6 espécies parasitas.

### 3.1.2.1. Análise da influência do sexo do hospedeiro

A totalidade dos 200 ratinhos capturados no arquipélago da Madeira era constituída por 114 machos (57,0%) e 86 fêmeas (43,0%). Na ilha da Madeira foram capturados 161 animais, sendo esta amostra constituída por 88 machos (54,7%) e 73 fêmeas (45,3%), já na ilha de Porto Santo foram capturados 39 ratinhos subdividindo-se em 26 machos (66,7%) e 13 fêmeas (33,3%) (Tabela 15).

Tabela 15 – Distribuição dos ratinhos em função do sexo no Arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

	Arquipélago da Madeira		Ilha da Madeira		Ilha de Porto Santo	
	n	%	n	%	n	%
Machos	114	57,0	88	54,7	26	66,7
Fêmeas	86	43,0	73	45,3	13	33,3
Total	200	100,0	161	100,0	39	100,0

Considerando a composição qualitativa da helmintofauna gastrointestinal e hepática em função do sexo dos animais capturados no arquipélago, verificou-se que as fêmeas apresentavam todas as espécies identificadas enquanto os machos apresentavam todas com exceção dos céstodes adultos *H. diminuta* e *R. nana* (Tabelas 16 e 17). No caso da ilha da Madeira verificou-se a ausência de *Brachylaima* sp., *H. diminuta* e *R. nana* nos machos e a presença de todas as espécies parasitas identificadas nessa ilha nas fêmeas (Figura 24, Tabelas 16 e 17). Na ilha de Porto Santo verificou-se a ausência de *M. muris* nas fêmeas enquanto os machos apresentaram todas as espécies de parasitas identificadas nessa ilha (Figura 25, Tabelas 16 e 17).

Figura 24 – Distribuição das prevalências parasitárias em função do sexo de *Mus musculus domesticus* na ilha da Madeira.

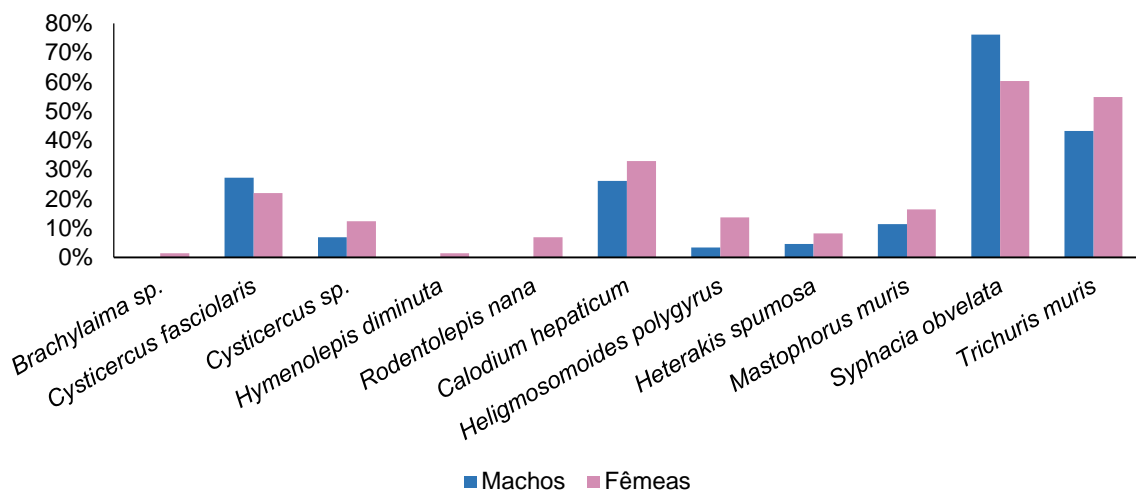


Figura 25 – Distribuição das prevalências parasitárias em função do sexo de *Mus musculus domesticus* na ilha de Porto Santo.

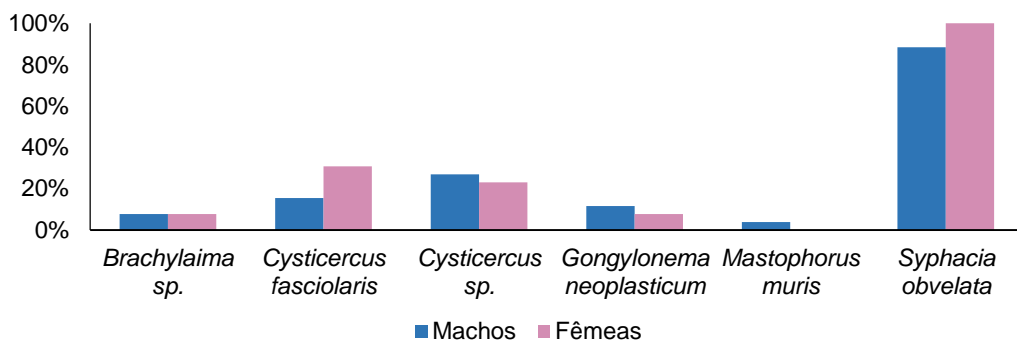


Tabela 16 – Prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades para exemplares de *Mus musculus domesticus* do sexo masculino no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

Espécie	Localização Hospedeiro	Arquipélago da Madeira n=114					Ilha da Madeira n=88					Ilha de Porto Santo n=26				
		Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.
<b>TREMÁTODES</b>		<b>2</b>	<b>1,8</b>	<b>0,5-6,2</b>	–	–	<b>0</b>	<b>0,0</b>	–	–	–	<b>2</b>	<b>7,7</b>	<b>2,1-24,1</b>	–	–
<i>Brachylaima</i> sp.	I.D.	2	1,8	0,5-6,2	17,50	(8-27)	0	0,0	–	0	0	2	7,7	2,1-24,1	17,50	(8-27)
<b>CÉSTODES</b>		<b>39</b>	<b>34,2</b>	<b>26,1-43,3</b>	–	–	<b>28</b>	<b>31,8</b>	<b>23,0-42,1</b>	–	–	<b>11</b>	<b>42,3</b>	<b>25,5-61,1</b>	–	–
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	Fígado	28	24,6	17,6-33,2	1,39	(1-5)	24	27,3	19,1-37,4	1,42	(1-5)	4	15,4	6,2-33,5	1,25	(1-2)
<i>Cysticercus</i> sp.	Fígado	13	11,4	6,8-18,5	1,15	(1-2)	6	6,8	3,2-14,1	1,17	(1-2)	7	26,9	13,7-46,1	1,14	(1-2)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	I.D.	0	0,0	–	0	0	0	0,0	–	0	0					
<i>Rodentolepis nana</i>	I.D.	0	0,0	–	0	0	0	0,0	–	0	0					
<b>NEMÁTODES</b>		<b>100</b>	<b>87,7</b>	<b>80,4-92,5</b>	–	–	<b>77</b>	<b>87,5</b>	<b>79,0-92,9</b>	–	–	<b>23</b>	<b>88,5</b>	<b>71,0-96,0</b>	–	–
<i>Calodium hepaticum</i>	Fígado	23	20,2	13,8-28,5	2,26	(1-3)	23	26,1	18,1-36,2	2,26	(1-3)					
<i>Gongylonema neoplasticum</i>	Estômago	3	2,6	0,9-7,5	1,67	(1-3)						3	11,5	4,0-29,0	1,67	(1-3)
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	I.D.	3	2,6	0,9-7,5	50,00	(29-89)	3	3,4	1,2-9,5	50,00	(29-89)					
<i>Heterakis spumosa</i>	I.G.	4	3,5	1,4-8,7	1,00	(1)	4	4,5	1,8-11,1	1,00	(1)					
<i>Mastophorus muris</i>	Estômago	11	9,6	5,5-16,5	2,09	(1-8)	10	11,4	6,3-19,7	2,20	(1-8)	1	3,8	0,7-18,9	1,00	(1)
<i>Syphacia obvelata</i>	I.G.	90	78,9	70,6-85,4	27,37	(1-134)	67	76,1	66,3-83,8	26,37	(1-134)	23	88,5	71,0-96,0	30,26	(1-107)
<i>Trichuris muris</i>	I.G.	38	33,3	25,3-42,4	6,74	(1-45)	38	43,2	33,3-53,6	6,74	(1-45)					
<b>Total parasitados</b>	–	<b>104</b>	<b>91,2</b>	<b>84,6-95,2</b>	–	–	<b>79</b>	<b>89,8</b>	<b>81,7-94,5</b>	–	–	<b>25</b>	<b>96,2</b>	<b>81,1-99,3</b>	–	–

Pos.: Positivos; Prev.: Prevalência; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; I.M.: Intensidade Média; A.I.: Amplitude de Intensidades. “–” Não se aplica; células a cinzento: parasitas não identificados nesses locais.

Tabela 17 – Prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades para exemplares de *Mus musculus domesticus* do sexo feminino no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

Espécie	Localização Hospedeiro	Arquipélago da Madeira n=86					Ilha da Madeira n=73					Ilha de Porto Santo n=13				
		Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.
<b>TREMÁTODES</b>		<b>2</b>	<b>2,3</b>	<b>0,6-8,1</b>	–	–	<b>1</b>	<b>1,4</b>	<b>0,2-7,4</b>	–	–	<b>1</b>	<b>7,7</b>	<b>1,4-33,3</b>	–	–
<i>Brachylaima</i> sp.	I.D.	2	2,3	0,6-8,1	7,50	(1-14)	1	1,4	0,2-7,4	1,00	(1)	1	7,7	1,4-33,3	14,00	(14)
<b>CÉSTODES</b>		<b>36</b>	<b>41,9</b>	<b>32,0-52,4</b>	–	–	<b>29</b>	<b>39,7</b>	<b>29,3-51,2</b>	–	–	<b>7</b>	<b>53,8</b>	<b>29,1-76,8</b>	–	–
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	Fígado	20	23,3	15,6-33,2	1,20	(1-4)	16	21,9	14,0-32,7	1,25	(1-4)	4	30,8	12,7-57,6	1,00	(1)
<i>Cysticercus</i> sp.	Fígado	12	14,0	8,2-22,8	1,50	(1-4)	9	12,3	6,6-21,8	1,67	(1-4)	3	23,1	8,2-50,3	1,00	(1)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	I.D.	1	1,2	0,2-6,3	1,00	(1)	1	1,4	0,2-7,4	1,00	(1)					
<i>Rodentolepis nana</i>	I.D.	5	5,8	2,5-12,9	∅	∅	5	6,8	3,0-15,1	∅	∅					
<b>NEMÁTODES</b>		<b>76</b>	<b>88,4</b>	<b>79,9-93,6</b>	–	–	<b>63</b>	<b>86,3</b>	<b>76,6-92,4</b>	–	–	<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>77,2-100,0</b>	–	–
<i>Calodium hepaticum</i>	Fígado	24	27,9	19,5-38,2	2,83	(1-3)	24	32,9	23,2-44,3	2,83	(1-3)					
<i>Gongylonema neoplasticum</i>	Estômago	1	1,2	0,2-6,3	2,00	(2)						1	7,7	1,4-33,3	2,00	(2)
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	I.D.	10	11,6	6,4-20,1	34,00	(2-97)	10	13,7	7,6-23,4	34,00	(2-97)					
<i>Heterakis spumosa</i>	I.G.	6	7,0	3,2-14,4	1,33	(1-2)	6	8,2	3,8-16,8	1,33	(1-2)					
<i>Mastophorus muris</i>	Estômago	12	14,0	8,2-22,8	10,17	(1-57)	12	16,4	9,7-26,6	10,17	(1-57)	0	0,0	–	0	0
<i>Syphacia obvelata</i>	I.G.	57	66,3	55,8-75,4	20,65	(1-146)	44	60,3	48,8-70,7	19,34	(1-124)	13	100,0	77,2-100,0	25,08	(1-146)
<i>Trichuris muris</i>	I.G.	40	46,5	36,3-57,0	7,45	(1-48)	40	54,8	43,4-65,7	7,45	(1-48)					
<b>Total parasitados</b>	–	<b>78</b>	<b>90,7</b>	<b>82,7-95,2</b>	–	–	<b>65</b>	<b>89,0</b>	<b>79,8-94,3</b>	–	–	<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>77,2-100,0</b>	–	–

Pos.: Positivos; Prev.: Prevalência; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; I.M.: Intensidade Média; A.I.: Amplitude de Intensidades. “–” Não se aplica; “∅” ausência de dados por fragmentação dos exemplares; células a cinzento: parasitas não identificados nesses locais.

Relativamente à composição quantitativa, nomeadamente a prevalência da helmintofauna gastrointestinal e hepática em função do sexo dos ratinhos capturados (Tabela 18), verificou-se que não existe diferença estatisticamente significativa na composição parasitária entre machos e fêmeas nas duas ilhas estudadas, contudo verificaram-se diferenças significativas em duas espécies de nemátodes ( $p < 0,05$ ) quer no arquipélago quer na ilha da Madeira. No caso dos ratinhos positivos a *Syphacia obvelata* verificou-se que os machos apresentaram uma prevalência mais elevada (78,9% e 76,1% respetivamente) relativamente às fêmeas (66,3% e 60,3% respetivamente), já no caso de *Heligmosomoides polygyrus*, identificado apenas na ilha da Madeira, verificou-se que, apesar de apresentar uma pequena proporção de animais positivos a este parasita, as fêmeas apresentaram uma prevalência mais elevada (11,6% e 13,7% respetivamente) relativamente aos machos (2,6 e 3,4% respetivamente).

Tabela 18 – Influência do sexo de exemplares de *Mus musculus domesticus* na prevalência das espécies de parasitas no arquipélago e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

Espécie	Arquipélago		Ilha da Madeira		Ilha de Porto Santo	
	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
<b>Tremátodes</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>
<i>Brachylaima</i> sp.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>Céstodes</b>	<b>1,224</b>	<b>0,269</b>	<b>1,091</b>	<b>0,296</b>	<b>0,464</b>	<b>0,496</b>
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	0,046	0,831	0,613	0,434	F	0,402 <sup>a</sup>
<i>Cysticercus</i> sp.	0,291	0,589	1,434	0,231	F	1,000 <sup>a</sup>
<i>Hymenolepis diminuta</i>	(-)	(-)	(-)	(-)		
<i>Rodentolepis nana</i>	(-)	(-)	(-)	(-)		
<b>Nemátodes</b>	<b>0,020</b>	<b>0,888</b>	<b>0,051</b>	<b>0,822</b>	<b>F</b>	<b>0,538<sup>a</sup></b>
<i>Calodium hepaticum</i>	1,630	0,202	0,877	0,349		
<i>Gongylonema neoplasticum</i>	(-)	(-)			(-)	(-)
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	6,529	0,011*	5,691	0,017*		
<i>Heterakis spumosa</i>	F	0,333 <sup>a</sup>	F	0,514 <sup>a</sup>		
<i>Mastophorus muris</i>	0,892	0,345	0,871	0,351	(-)	(-)
<i>Syphacia obvelata</i>	4,039	0,045*	4,689	0,030*	F	0,538 <sup>a</sup>
<i>Trichuris muris</i>	3,578	0,059	2,154	0,142		
<b>Total Parasitados</b>	<b>0,017</b>	<b>0,897</b>	<b>0,023</b>	<b>0,881</b>	<b>F</b>	<b>1,000<sup>a</sup></b>

Células a cinzento: parasitas não identificados nesses locais; (-) Valor não calculado por amostragem insuficiente; \* Valor significativo ( $p \leq 0,05$ ); <sup>a</sup> Teste Exacto de Fisher (F).

No que diz respeito à análise de intensidades médias da helmintofauna gastrointestinal e hepática em função do sexo dos ratinhos capturados, foi apenas possível fazer esta análise para os metacéstodes *Cysticercus fasciolaris*, *Cysticercus* sp. e para os nemátodes *Mastophorus muris*, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*. Uma vez que a amostra não apresentou uma distribuição normal, recorreu-se ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para proceder à análise das intensidades entre os dois grupos. Este teste não requer uma distribuição normal dos dados, contudo requer homogeneidade de variâncias entre os grupos a comparar, pelo que foi realizado o Teste de Levene, para verificação da homogeneidade de

variâncias. O Teste de Levene revelou que as variâncias eram significativamente desiguais no caso dos metacéstodes *C. fasciolaris* identificado na ilha de Porto Santo e *Cysticercus* sp. no arquipélago e no caso dos nemátodes *M. muris* identificados no arquipélago e ilha da Madeira e ainda *S. obvelata* na ilha da Madeira, impossibilitando a realização do Teste U de Mann-Whitney nestes casos. Nas restantes espécies, o Teste de Levene revelou que a diferença entre as variâncias dos dois grupos, machos e fêmeas, não era estatisticamente significativa e portanto assumindo-se variâncias iguais foi possível a utilização do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Verificou-se assim que apesar dos machos apresentarem uma intensidade média de infeção por *S. obvelata* mais elevada que as fêmeas, no arquipélago e na ilha de Porto Santo (Tabelas 16 e 17), e para as restantes espécies, as fêmeas apresentarem intensidades médias de infeção ligeiramente superiores às dos machos, estas diferenças revelaram não ser estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), ou seja, as intensidades de infeção, dos parasitas passíveis de análise estatística, não foram, do ponto de vista estatístico, influenciadas pelo sexo do hospedeiro. (Tabela 19).

Tabela 19 – Influência do sexo de exemplares de *Mus musculus domesticus* na Intensidade das espécies de parasitas no arquipélago e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

Espécie	Arquipélago			Ilha da Madeira			Ilha de Porto Santo		
	Levene p	Mann-Whitney Z	p	Levene p	Mann-Whitney Z	p	Levene p	Mann-Whitney Z	P
<b>Céstodes</b>									
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	0,257	-1,465	0,142	0,462	-1,138	0,285	0,024*	–	–
<i>Cysticercus</i> sp.	0,031*	–	–	0,111	-1,137	0,434	0,168	-0,655	1,000
<b>Nemátodes</b>									
<i>Mastophorus muris</i>	0,003**	–	–	0,005**	–	–	(-)	(-)	(-)
<i>Syphacia obvelata</i>	0,079	-0,850	0,397	0,049*	–	–	0,819	-0,512	0,619
<i>Trichuris muris</i>	0,864	-0,431	0,670	0,864	-0,431	0,670			

Células a cinzento: parasitas não identificados nesses locais; (-) Valor não calculado por amostragem insuficiente; “–” Não se aplica por variâncias desiguais. Valores significativos \* ( $p \leq 0,05$ ) e \*\* ( $p \leq 0,01$ ).

Relativamente ao tipo de infeção por helmintes gastrointestinais e hepáticos em função do sexo dos ratinhos parasitados no arquipélago da Madeira (Tabela 20), verificou-se que 28,6% dos machos apresentavam infeção simples *versus* 71,4% que se apresentavam com infeção mista, enquanto 30,8% das fêmeas apresentavam infeção simples *versus* 74,4% que se apresentavam com infeção mista. A infeção mista por duas espécies parasitas verificou-se ser a mais prevalente em ambos os sexos, seguida da infeção simples e a infeção mista por três espécies parasitas. Apesar do número total de fêmeas e machos capturados que estavam parasitados ser desigual no arquipélago, não existe diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,134$ ) entre o tipo de infeção e o sexo dos ratinhos analisados, revelando a falta de associação entre o tipo de infeção e o facto de ser macho ou fêmea.

No caso particular de cada ilha (Tabela 20), verificou-se que para a ilha da Madeira 25,3% dos machos apresentavam-se com infeção simples *versus* 74,7% com infeção mista, 23,1% das fêmeas possuíam infeção simples *versus* 76,9% que se apresentavam com infeção mista. De referir que nos machos, as infeções mistas presentes variaram entre duas a cinco espécies parasitas, enquanto nas fêmeas foi identificado um espécime que apresentava uma infeção mista com seis espécies parasitas. Observou-se ainda que a infeção mista com duas espécies parasitas era a de maior prevalência em ambos os sexos (39,2% e 32,3% respetivamente). Já na ilha de Porto Santo, 48% dos machos apresentavam-se com infeção simples *versus* 52% com infeção mista, 38,5% das fêmeas possuíam infeção simples *versus* 61,5% que possuíam infeção mista. Ambos os sexos apresentaram infeções mistas, que variaram entre duas a três espécies parasitas, sendo que a infeção mista com duas espécies parasitas revelou ser a de maior prevalência em ambos (44% e 53,8% respetivamente) (Tabela 20). Apesar do número total de fêmeas e machos parasitados ser desigual nas duas ilhas, não existe diferença estatisticamente significativa (Madeira:  $p = 0,188$ ; Porto Santo  $p = 0,840$ ) entre o tipo de infeção e o sexo dos ratinhos analisados, situação igualmente verificada para a totalidade dos dados do arquipélago.

Tabela 20 – Distribuição dos ratinhos em função do género e tipo de infeção no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

Tipo de infeção	Arquipélago				Ilha da Madeira				Ilha de Porto Santo			
	Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Simple	32	30,8	20	25,6	20	25,3	15	23,1	12	48,0	5	38,5
Infeção mista (2)	42	40,4	28	35,9	31	39,2	21	32,3	11	44,0	7	53,8
Infeção mista (3)	23	22,1	14	17,9	21	26,6	13	20,0	2	8,0	1	7,7
Infeção mista (4)	5	4,8	9	11,5	5	6,3	9	13,8	0	0,0	0	0,0
Infeção mista (5)	2	1,9	6	7,7	2	2,5	6	9,2	0	0,0	0	0,0
Infeção mista (6)	0	0,0	1	1,3	0	0,0	1	1,5	0	0,0	0	0,0
Total Infeções mistas	72	69,2	58	74,4	59	74,7	50	76,9	13	52,0	8	61,5
Total Parasitados	104	100	78	100	79	89,8	65	89,0	25	96,2	13	100

### 3.1.2.2. Análise da influência da idade do hospedeiro

A determinação da idade de exemplares de ratinho-caseiro na natureza baseia-se habitualmente numa estimativa tendo por base uma ou mais características morfológicas. A utilização do peso para este efeito permite uma estimativa aproximada da faixa etária dos ratinhos uma vez que pode não corresponder à idade exata, dados os inúmeros fatores que o afetam (Crowcroft & Rowe, 1961; Singleton & Krebs, 2007). Desta forma a categorização em juvenis e adultos, como referido no Material e Métodos, permitiu realizar as seguintes análises estatísticas com um número significativo de elementos para cada faixa etária.

Da totalidade dos 200 ratinhos capturados no arquipélago da Madeira foi possível obter informação sobre o peso de 188 animais, característica esta que permitiu a divisão dos exemplares em duas faixas etárias, sendo que animais com peso inferior a 12 g constituíram o grupo dos juvenis (36 animais, correspondendo a 19,1% da amostra) enquanto os animais com peso igual ou superior a 12 g constituíram o grupo dos adultos (152 animais, correspondendo a 80,9% da amostra) (Tabela 21).

Para a ilha da Madeira foi possível obter a informação do peso de 159 animais, 22 dos quais pertenciam ao grupo dos juvenis (13,8%) e 137 ao grupo dos adultos (86,2%), já na ilha de Porto Santo foi possível obter o peso de 29 animais dos quais 14 pertenciam ao grupo dos juvenis (48,3%) e 15 ao grupo dos adultos (51,7%) (Tabela 21).

Tabela 21 – Distribuição dos ratinhos em função da idade no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

	Arquipélago da Madeira		Ilha da Madeira		Ilha de Porto Santo	
	n	%	n	%	n	%
Juvenis (< 12 g)	36	19,1%	22	13,8%	14	48,3%
Adultos (≥ 12 g)	152	80,9%	137	86,2%	15	51,7%
Total	188	100%	159	100%	29	100%

Considerando a composição qualitativa da helmintofauna gastrointestinal e hepática em função da idade dos animais capturados no arquipélago, verificou-se a presença de todas as espécies identificadas nos animais adultos, enquanto nos juvenis foram identificadas apenas 7 das 12 espécies, nomeadamente *C. fasciolaris*, *Cysticercus* sp., *C. hepaticum*, *G. neoplasticum*, *M. muris*, *S. obvelata* e *T. muris* (Tabelas 22 e 23).

No caso da ilha da Madeira, verificou-se a ausência de *Brachylaima* sp., *H. diminuta*, *R. nana*, *H. polygyrus* e *H. spumosa* nos juvenis e a presença de todas as espécies parasitas identificadas nesta ilha nos adultos (Tabelas 22 e 23, Figura 26).

Já na ilha de Porto Santo verificou-se a ausência de *Brachylaima* sp. e *M. muris* nos juvenis, enquanto os adultos apresentaram todas as espécies de parasitas identificadas nessa ilha (Tabelas 22 e 23, Figura 27).

Tabela 22 – Prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades para exemplares de *Mus musculus domesticus* juvenis do arquipélago da Madeira e das ilhas da Madeira e de Porto Santo.

Espécie	Localização Hospedeiro	Arquipélago da Madeira n=36					Ilha da Madeira n=22					Ilha de Porto Santo n=14				
		Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.
<b>TREMÁTODES</b>		<b>0</b>	<b>0,0</b>	–	<b>0,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>	–	–	–	<b>0</b>	<b>0,0</b>	–	–	–
<i>Brachylaima</i> sp.	I.D.	0	0,0	–	0,00	0	0	0,0	–	0,00	0	0	0,0	–	0,00	0
<b>CÉSTODES</b>		<b>12</b>	<b>33,3</b>	<b>20,2-49,7</b>	–	–	<b>4</b>	<b>18,2</b>	<b>7,3-38,5</b>	–	–	<b>8</b>	<b>57,1</b>	<b>32,6-78,6</b>	–	–
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	Fígado	5	13,9	6,1-28,7	1,20	(1-2)	3	13,6	4,7-33,3	1,00	(1)	2	14,3	4,0-39,9	1,50	(1-2)
<i>Cysticercus</i> sp.	Fígado	7	19,4	9,8-35,0	1,14	(1-2)	1	4,5	0,8-21,8	1,00	(1)	6	42,9	21,4-67,4	1,17	(1-2)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	I.D.	0	0,0	–	0,00	0	0	0,0	–	0,00	0					
<i>Rodentolepis nana</i>	I.D.	0	0,0	–	0,00	0	0	0,0	–	0,00	0					
<b>NEMÁTODES</b>		<b>30</b>	<b>83,3</b>	<b>68,1-92,1</b>	–	–	<b>16</b>	<b>72,7</b>	<b>51,8-86,8</b>	–	–	<b>14</b>	<b>100,0</b>	<b>78,5-100,0</b>	–	–
<i>Calodium hepaticum</i>	Fígado	1	2,8	0,5-14,2	2,26	(3)	1	4,5	0,8-21,8	2,26	(3)					
<i>Gongylonema neoplasticum</i>	Estômago	1	2,8	0,5-14,2	2,00	(2)					1					7,1
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	I.D.	0	0,0	–	0,00	0	0	0,0	–	0,00	0					
<i>Heterakis spumosa</i>	I.G.	0	0,0	–	0,00	0	0	0,0	–	0,00	0					
<i>Mastophorus muris</i>	Estômago	2	5,6	1,5-18,1	1,00	(1)	2	9,1	2,5-27,8	1,00	(1)	0	0,0	–	0,00	0
<i>Syphacia obvelata</i>	I.G.	29	80,6	65,0-90,2	18,17	(1-79)	15	68,2	47,3-83,6	18,40	(1-79)	14	100,0	78,5-100,0	17,93	(1-66)
<i>Trichuris muris</i>	I.G.	4	11,1	4,4-25,3	2,00	(1-4)	4	18,2	7,3-38,5	2,00	(1-4)					
<b>Total parasitados</b>		<b>32</b>	<b>88,9</b>	<b>74,7-95,6</b>	–	–	<b>18</b>	<b>81,8</b>	<b>61,5-92,7</b>	–	–					<b>14</b>

Pos.: Positivos; Prev.: Prevalência; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; I.M.: Intensidade Média; A.I.: Amplitude de Intensidades. “–” Não se aplica; células a cinzento: parasitas não identificados nesses locais.

Tabela 23 – Prevalência, intensidade média e amplitude de intensidades para exemplares de *Mus musculus domesticus* adultos do arquipélago da Madeira e das ilhas da Madeira e de Porto Santo.

Espécie	Localização Hospedeiro	Arquipélago da Madeira n=152					Ilha da Madeira n=137					Ilha de Porto Santo n=15				
		Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.	Pos.	Prev. (%)	IC95%	I.M.	A.I.
<b>TREMÁTODES</b>		<b>4</b>	<b>2,6</b>	<b>1,0-6,6</b>	–	–	<b>1</b>	<b>0,7</b>	<b>0,1-4,0</b>	–	–	<b>3</b>	<b>20,0</b>	<b>7,0-45,2</b>	–	–
<i>Brachylaima</i> sp.	I.D.	4	2,6	1,0-6,6	12,50	(1-27)	1	0,7	0,1-4,0	1,00	(1)	3	20,0	7,0-45,2	16,33	(8-27)
<b>CÉSTODES</b>		<b>60</b>	<b>39,5</b>	<b>32,1-47,4</b>	–	–	<b>52</b>	<b>38,0</b>	<b>30,3-46,3</b>	–	–	<b>8</b>	<b>53,3</b>	<b>30,1-75,2</b>	–	–
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	Fígado	42	27,6	21,1-35,2	1,33	(1-5)	37	27,0	20,3-35,0	1,38	(1-5)	5	33,3	15,2-58,3	1,00	(1)
<i>Cysticercus</i> sp.	Fígado	16	10,5	6,6-16,4	1,44	(1-4)	13	9,5	5,6-15,6	1,54	(1-4)	3	20,0	7,0-45,2	1,00	(1)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	I.D.	1	0,7	0,1-3,6	1,00	(1)	1	0,7	0,1-4,0	1,00	(1)					
<i>Rodentolepis nana</i>	I.D.	5	3,3	1,4-7,5	∅	∅	5	3,6	1,6-8,3	∅	∅					
<b>NEMÁTODES</b>		<b>135</b>	<b>88,8</b>	<b>82,8-92,9</b>	–	–	<b>123</b>	<b>89,8</b>	<b>83,6-93,8</b>	–	–	<b>12</b>	<b>80,0</b>	<b>54,8-93,0</b>	–	–
<i>Calodium hepaticum</i>	Fígado	46	30,3	23,5-38,0	2,54	(1-3)	46	33,6	26,2-41,8	2,54	(1-3)					
<i>Gongylonema neoplasticum</i>	Estômago	2	1,3	0,4-4,7	2,00	(1-3)						2	13,3	3,7-37,9	2,00	(1-3)
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	I.D.	13	8,6	5,1-14,1	37,69	(2-97)	13	9,5	5,6-15,6	37,69	(2-97)					
<i>Heterakis spumosa</i>	I.G.	9	5,9	3,1-10,9	1,22	(1-2)	9	6,6	3,5-12,0	1,22	(1-2)					
<i>Mastophorus muris</i>	Estômago	21	13,8	9,2-20,2	6,81	(1-57)	20	14,6	9,7-21,5	7,10	(1-57)	1	6,7	1,2-29,8	1,00	1
<i>Syphacia obvelata</i>	I.G.	107	70,4	62,7-77,1	27,61	(1-146)	95	69,3	61,2-76,4	24,64	(1-134)	12	80,0	54,8-93,0	51,08	(2-146)
<i>Trichuris muris</i>	I.G.	73	48,0	40,2-55,9	7,38	(1-48)	73	53,3	45,0-61,4	7,38	(1-48)					
<b>Total parasitados</b>		<b>138</b>	<b>90,8</b>	<b>85,1-94,4</b>	–	–	<b>124</b>	<b>90,5</b>	<b>84,4-94,4</b>	–	–	<b>14</b>	<b>93,3</b>	<b>70,2-98,8</b>	–	–

Pos.: Positivos; Prev.: Prevalência; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; I.M.: Intensidade Média; A.I.: Amplitude de Intensidades. “–” Não se aplica; “∅” ausência de dados por fragmentação dos exemplares; células a cinzento: parasitas não identificados nesses locais.

Figura 26 – Distribuição das prevalências parasitárias em função da idade de *Mus musculus domesticus* na ilha da Madeira.

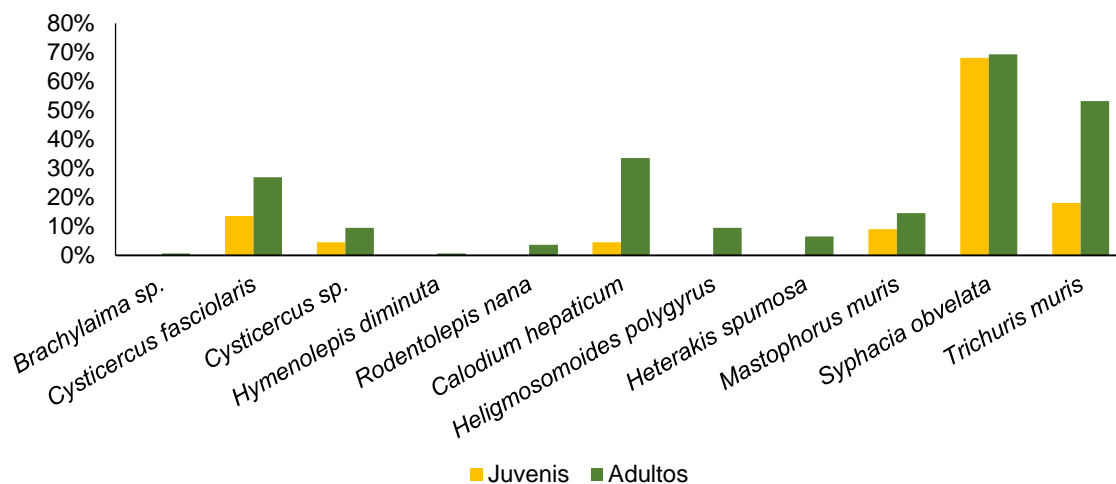
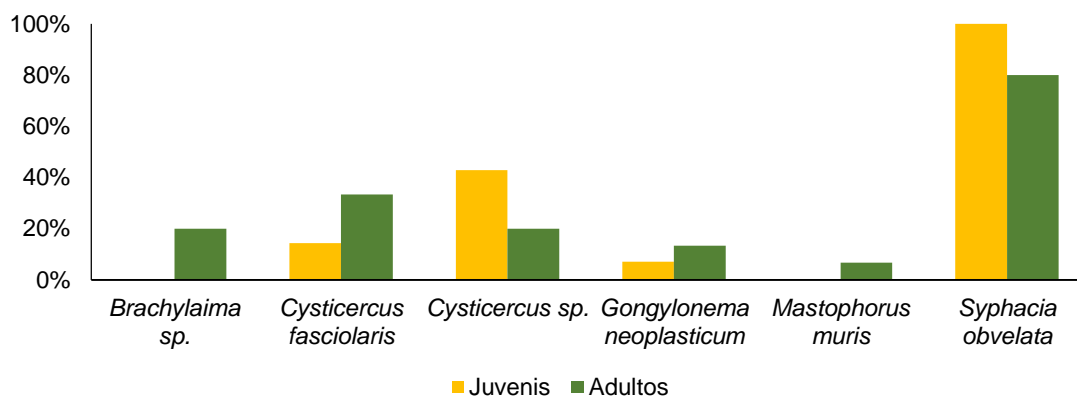


Figura 27 – Distribuição das prevalências parasitárias em função da idade de *Mus musculus domesticus* na ilha de Porto Santo.



Relativamente à análise da prevalência da helmintofauna gastrointestinal e hepática em função da idade dos ratinhos capturados, verificou-se que apenas existem diferenças significativas em duas espécies de nemátodes ( $p < 0,05$ ) quer para o arquipélago, quer para a ilha da Madeira, única ilha onde foram identificadas (Tabela 24).

No caso particular dos ratinhos da ilha da Madeira positivos a *Calodium hepaticum* verificou-se que os adultos apresentaram uma prevalência mais elevada (33,6%) relativamente aos juvenis (4,5%), verificando-se também no caso de *Trichuris muris* a mesma tendência, com os adultos a apresentarem uma prevalência mais elevada (53,3%) relativamente aos juvenis (18,2%), apresentando ambas as situações um valor de  $p < 0,01$  (Tabela 24).

Tabela 24 – Influência da idade dos exemplares de *Mus musculus domesticus* na prevalência das espécies de parasitas no arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

Espécie	Arquipélago		Ilha da Madeira		Ilha de Porto Santo	
	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
<b>Tremátodes</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Brachylaima</i> sp.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>Céstodes</b>	<b>0,464</b>	<b>0,496</b>	<b>3,249</b>	<b>0,072</b>	<b>0,042</b>	<b>0,837</b>
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	2,932	0,087	1,800	0,180	F	0,390 <sup>a</sup>
<i>Cysticercus</i> sp.	F	0,159 <sup>a</sup>	F	0,694 <sup>a</sup>	F	0,245 <sup>a</sup>
<i>Hymenolepis diminuta</i>	(-)	(-)	(-)	(-)		
<i>Rodentolepis nana</i>	(-)	(-)	(-)	(-)		
<b>Nemátodes</b>	<b>F</b>	<b>0,397</b>	<b>F</b>	<b>0,037<sup>a</sup></b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>
<i>Calodium hepaticum</i>	11,730	<0,001 <sup>***</sup>	7,673	0,006 <sup>**</sup>		
<i>Gongylonema neoplasticum</i>	(-)	(-)			F	1,000 <sup>a</sup>
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)		
<i>Heterakis spumosa</i>	(-)	(-)	(-)	(-)		
<i>Mastophorus muris</i>	F	0,259 <sup>a</sup>	F	0,741 <sup>a</sup>	(-)	(-)
<i>Syphacia obvelata</i>	1,502	0,220	0,012	0,913	(-)	(-)
<i>Trichuris muris</i>	16,400	<0,001 <sup>***</sup>	9,352	0,002 <sup>**</sup>		
Total Parasitados	F	0,754 <sup>a</sup>	F	0,259 <sup>a</sup>	(-)	(-)

Células a cinzento: parasitas não identificados nesses locais; (-) Valor não calculado por amostragem insuficiente; \*\* Valor significativo ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\* Valor significativo ( $p \leq 0,001$ ); <sup>a</sup> Teste Exacto de Fisher (F).

No que diz respeito à análise de intensidades médias da helmintofauna gastrointestinal e hepática em função da idade dos ratinhos capturados, foi apenas possível realizar esta análise estatística para os metacéstodes *Cysticercus fasciolaris* e *Cysticercus* sp. e para os nemátodes *Mastophorus muris*, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*. Os valores de intensidade destes parasitas, do arquipélago e de ambas as ilhas, foram submetidos ao Teste de Levene para verificação da homogeneidade de variâncias, seguido do Teste U de Mann-Whitney para comparação dos dois grupos etários. Verificou-se que no caso da amostra de *S. obvelata*, quer para a totalidade dos ratinhos (arquipélago) quer no caso da ilha de Porto Santo as variâncias das intensidades deste parasita nos dois grupos etários revelaram-se desiguais e muito desiguais respetivamente, impossibilitando a realização do Teste de Mann-Whitney. No caso de *S. obvelata* na ilha da Madeira, e para as restantes análises realizadas (Tabela 25) verificou-se que a diferença de variâncias não era estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) possibilitando a realização do teste U de Mann-Whitney.

Apesar da intensidade média do parasita *S. obvelata* na ilha da Madeira ser superior nos adultos (24,64) relativamente aos juvenis (18,40) esta diferença não se mostrou ser estatisticamente significativa, tendo-se verificado o mesmo para as restantes espécies parasitas analisadas, revelando que a idade do hospedeiro não influencia de forma significativa a intensidade de infeção por estas espécies (Tabela 25).

Tabela 25 – Influência da idade dos exemplares de *Mus musculus domesticus* na Intensidade das espécies de parasitas nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

Espécie	Arquipélago			Ilha da Madeira			Ilha de Porto Santo		
	Levene p	Mann-Whitney Z	p	Levene p	Mann-Whitney Z	p	Levene p	Mann-Whitney Z	P
<b>Céstodes</b>									
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	0,475	-0,121	0,957	0,132	-0,953	0,576	(-)	(-)	(-)
<i>Cysticercus</i> sp.	0,107	-0,872	0,571	(-)	(-)	(-)	0,131	-0,707	1,000
<b>Nemátodes</b>									
<i>Mastophorus muris</i>	0,286	-1,207	0,451	0,275	-1,249	0,420	(-)	(-)	(-)
<i>Syphacia obvelata</i>	0,020*	–	–	0,281	0,554	0,585	0,001***	–	–
<i>Trichuris muris</i>	0,148	-1,536	0,136	0,148	-1,536	0,136			

Células a cinzento: parasitas não identificados nesses locais; (-) Valor não calculado por amostragem insuficiente; “–” Não se aplica por variâncias desiguais. Valores significativos \* ( $p \leq 0,05$ ) e \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ).

Relativamente ao tipo de infeção por helmintes gastrointestinais e hepáticos em função da idade dos ratinhos parasitados no arquipélago da Madeira (Tabela 26), verificou-se que 53,1% dos juvenis apresentavam infeção simples *versus* 46,9% que se apresentavam com infeção mista, enquanto 19,6% dos adultos apresentavam infeção simples *versus* 80,4% que se apresentavam com infeção mista. No caso dos juvenis a infeção com maior prevalência foi a simples (53,1%), já nos adultos a infeção com maior prevalência foi a dupla (39,1%), seguida da tripla (24,6%) e finalmente a infeção simples (19,6%). Esta diferença entre o tipo de infeção nas duas faixas etárias foi estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) demonstrando que os adultos estão tendencialmente infetados com mais do que uma espécie parasita relativamente aos juvenis.

No caso particular de cada ilha (Tabela 26), verificou-se que para a ilha da Madeira 66,7% dos juvenis apresentavam-se com infeção simples *versus* 33,3% que se apresentavam com infeção mista por duas ou três espécies parasitas, enquanto 17,7% dos adultos possuíam infeção simples e 82,3% apresentavam infeção mista com duas a seis espécies parasitas. À semelhança do que se verificou no arquipélago, a infeção com maior prevalência nos juvenis foi a simples, já nos adultos a infeção com maior prevalência foi a dupla, seguida da tripla e finalmente a infeção simples (Tabela 26). Esta diferença entre o tipo de infeção nas duas faixas etárias foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) demonstrando que os adultos estão tendencialmente infetados com mais do que uma espécie parasita relativamente aos juvenis (Figura 27).

Já na ilha de Porto Santo, ao contrário da ilha da Madeira, 35,7% dos juvenis e dos adultos apresentavam-se com infeção simples *versus* 64,3% de cada grupo etário que se encontravam com infeção mista. A infeção mista nos juvenis foi de apenas duas espécies parasitas, constituindo a totalidade dos 64,3%, enquanto os adultos possuíam duas (42,9%) ou três (21,4%) espécies parasitas (Tabela 26). Nesta ilha a diferença entre o tipo de infeção

observada para os dois grupos etários revelou-se não ser estatisticamente significativa, pelo que neste caso, a faixa etária não parece ter influência no tipo de infeção.

Tabela 26 – Distribuição dos ratinhos em função da idade e tipo de infeção no Arquipélago da Madeira e nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

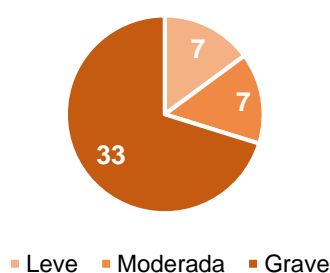
Tipo de infeção	Arquipélago				Ilha da Madeira				Ilha de Porto Santo			
	Juvenis		Adultos		Juvenis		Adultos		Juvenis		Adultos	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Simple	17	53,1	27	19,6	12	66,7	22	17,7	5	35,7	5	35,7
Infeção mista (2)	13	40,6	54	39,1	4	22,2	48	38,7	9	64,3	6	42,9
Infeção mista (3)	2	6,3	34	24,6	2	11,1	31	25,0	0	0,0	3	21,4
Infeção mista (4)	0	0,0	14	10,1	0	0,0	14	11,3	0	0,0	0	0,0
Infeção mista (5)	0	0,0	8	5,8	0	0,0	8	6,5	0	0,0	0	0,0
Infeção mista (6)	0	0,0	1	0,7	0	0,0	1	0,8	0	0,0	0	0,0
Total infeções mistas	15	46,9	111	80,4	6	33,3	102	82,3	9	64,3	9	64,3
Total Parasitados	32	100,0	138	100,0	18	100,0	124	100,0	14	100,0	14	100,0

### 3.1.2.3. Caso particular dos hospedeiros infetados por *Calodium hepaticum*

Dada a impossibilidade de individualização dos nemátodes adultos presentes no fígado e sua contagem, a classificação das lesões com base numa escala de três graus de intensidade permite caracterizar o nível de infeção destes animais. Foram detetados 47 ratinhos positivos a *Calodium hepaticum* na ilha na Madeira. Destes, 7 apresentavam-se com infeção leve, 7 com infeção moderada e 33 com infeção grave (Figura 28).

Figura 28 – Intensidade de infeção nos hospedeiros positivos a *Calodium hepaticum*.

Hospedeiros positivos (n = 47)



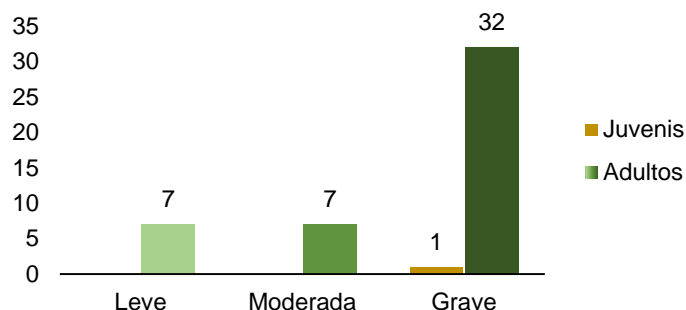
Após realização do Teste Exato de Fisher verificou-se que a diferença entre os graus de intensidade de infeção por *C. hepaticum* nos machos e nas fêmeas era estatisticamente significativa ( $p = 0,027$ ), verificando-se assim um maior número de infeções de intensidade grave nas fêmeas relativamente aos machos (Figura 29).

Figura 29 – Intensidade de infeção por *Calodium hepaticum* em função do sexo dos hospedeiros infetados.



Relativamente à intensidade de infeção por *C. hepaticum* em função da faixa etária, verificou-se que 32 animais adultos se apresentavam com uma infeção de intensidade grave, 7 com infeção moderada e 7 com infeção leve (Figura 30). Já nos juvenis, apenas 1 animal se encontrava infetado com *C. hepaticum*, apresentando uma infeção grave. Não foi possível a realização de análise estatística nestes dois grupos dada a baixa amostragem do grupo dos juvenis, contudo os adultos quando parasitados por *C. hepaticum*, apresentaram-se com níveis de infeção elevados.

Figura 30 – Intensidade de infeção por *Calodium hepaticum* em função da faixa etária dos hospedeiros infetados.



#### 3.1.2.4. Distribuição da infeção por localização geográfica do hospedeiro

Numa visão geral das distribuições geográficas dos ratinhos (Figura 31) foi possível observar que os ratinhos foram capturados na sua maioria na vertente norte e sudoeste de ambas as ilhas. Verificou-se ainda que o número máximo de parasitas por ratinho individual foi de seis. Foi possível observar associações frequentes entre os nemátodos *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*, e entre *Syphacia obvelata* e o céstode *Cysticercus fasciolaris*.

Ao analisar a distribuição geográfica dos ratinhos capturados nas duas ilhas verificou-se que *Cysticercus fasciolaris* e *Cysticercus* sp. se encontravam distribuídos por ambas as ilhas, sendo que na ilha da Madeira os animais infetados localizaram-se maioritariamente na vertente sudoeste da ilha (Figura 32).

Figura 31 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo de cada indivíduo analisado nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.

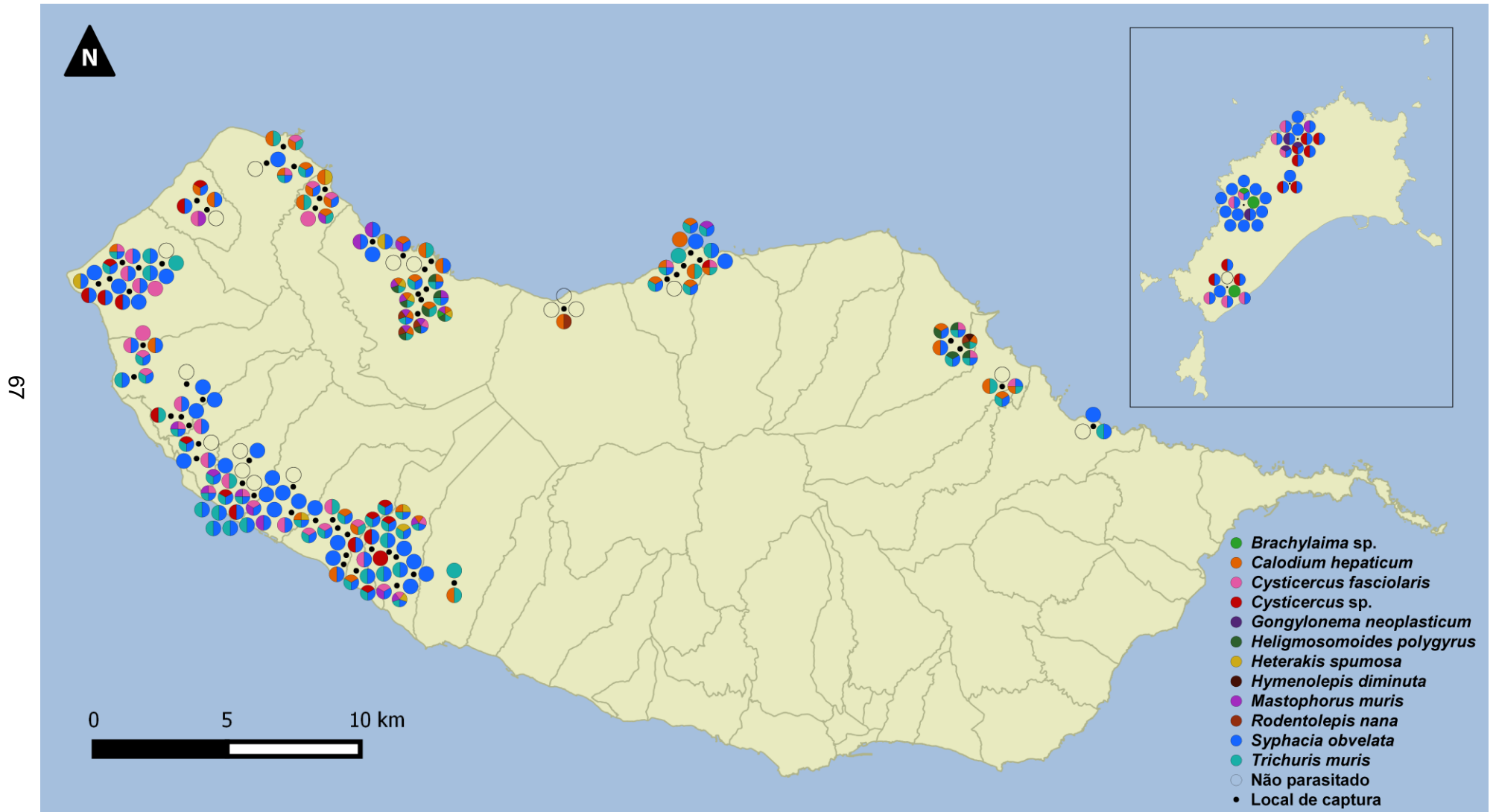
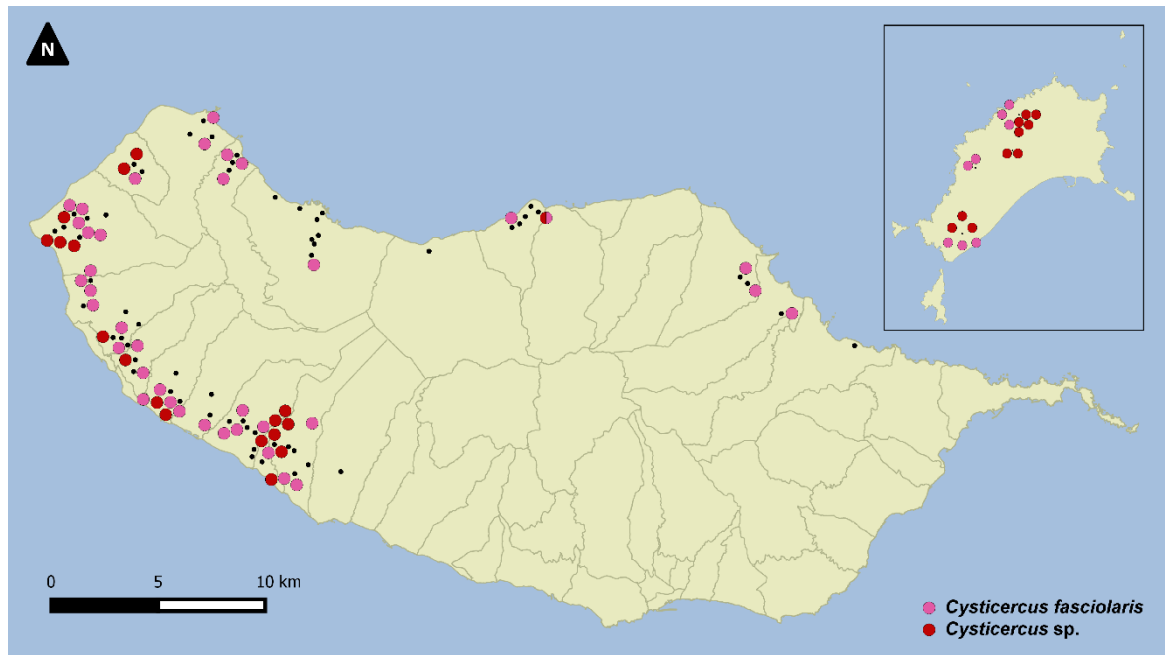
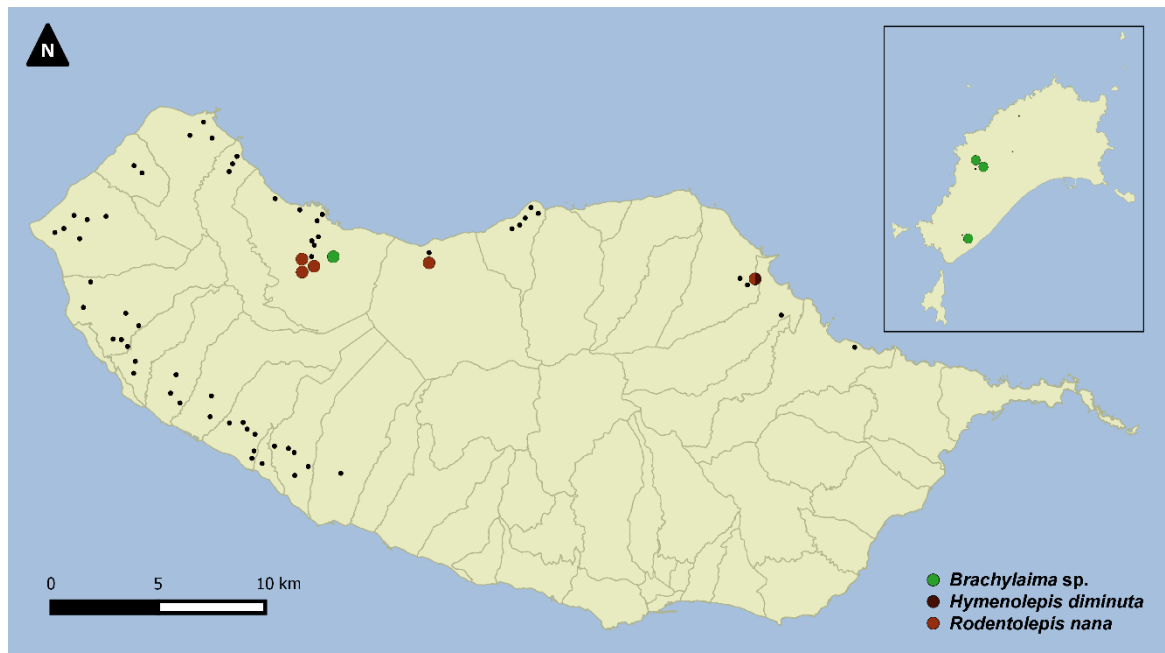


Figura 32 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por *Cysticercus fasciolaris* e *Cysticercus* sp. nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.



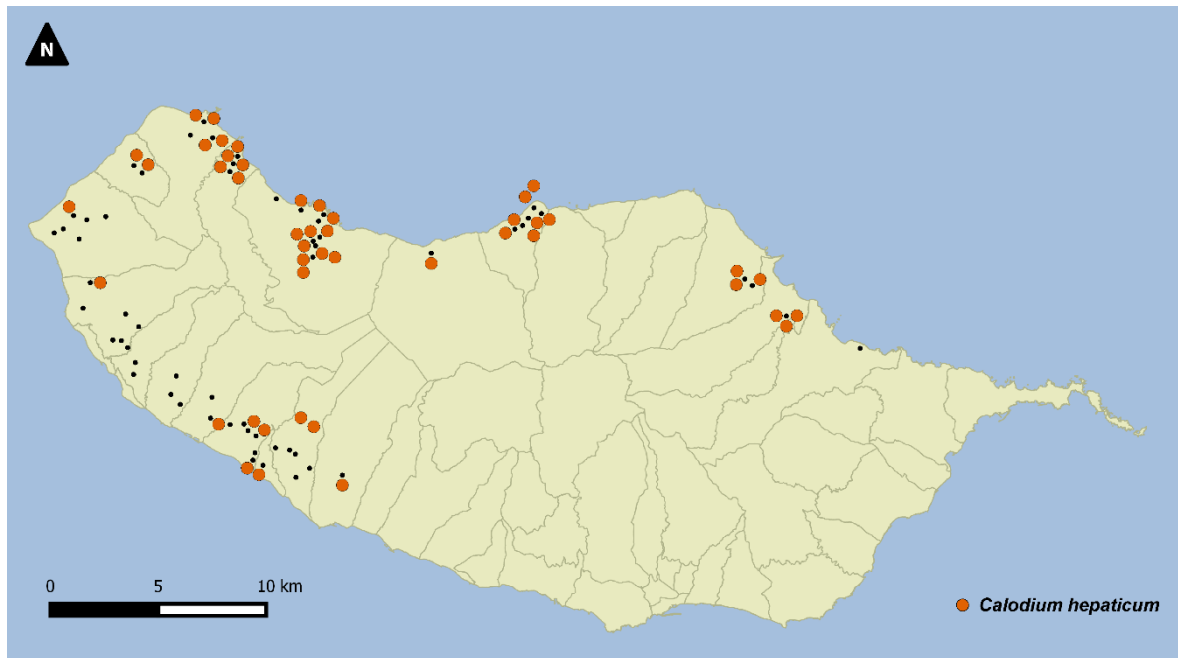
O trematóde *Brachylaima* sp. encontra-se presente em ambas as ilhas, já os céstodes *Hymenolepis diminuta* e *Rodentolepis nana* foram apenas identificados na vertente norte da ilha da Madeira (Figura 33).

Figura 33 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por *Brachylaima* sp. em ambas as ilhas e *Hymenolepis diminuta* e *Rodentolepis nana* na ilha da Madeira.



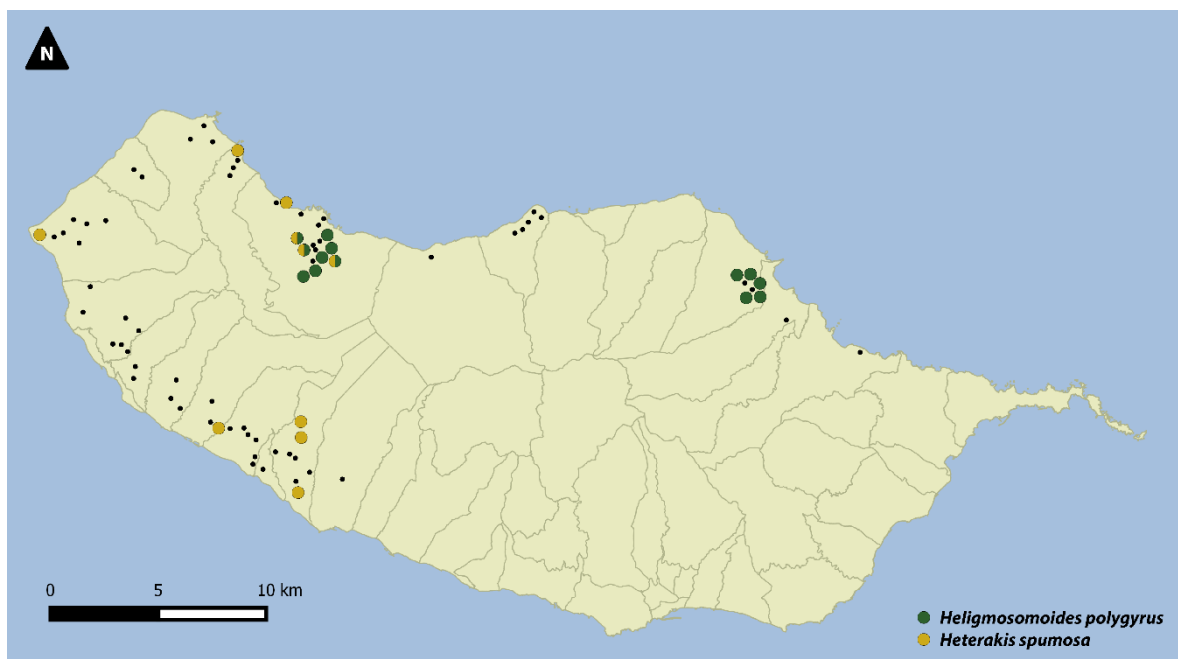
O nemátode hepático *Calodium hepaticum* foi apenas identificado na ilha da Madeira apresentando-se distribuído ao longo da costa, mas sobretudo na vertente norte (Figura 34).

Figura 34 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por *Calodium hepaticum* na ilha da Madeira.



Os parasitas *Heligmosomoides polygyrus* e *Heterakis spumosa* foram apenas identificados em exemplares capturados na ilha da Madeira, sendo que *H. polygyrus* foi identificado em duas localizações distintas na vertente norte da ilha e *H. spumosa* em diversos pontos da ilha, tanto a sudoeste como a norte (Figura 35).

Figura 35 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por *Heligmosomoides polygyrus* e *Heterakis spumosa* na ilha da Madeira.



O nemátode *Mastophorus muris* foi identificado em ambas as ilhas com a maioria dos exemplares infetados localizados na ilha da Madeira e apenas um na ilha de Porto Santo. Já o nemátode *Gongylonema neoplasticum* da mesma Superfamília foi apenas identificado em dois pontos distintos da ilha de Porto Santo (Figura 36). O oxiurídeo *Syphacia obvelata* foi identificado em ambas as ilhas, sendo o parasita com prevalência mais elevada, e aquele que aparentemente também tem uma maior distribuição pela ilha (Figura 37).

Figura 36 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por *Gongylonema neoplasticum* na ilha de Porto Santo e *Mastophorus muris* em ambas as ilhas.

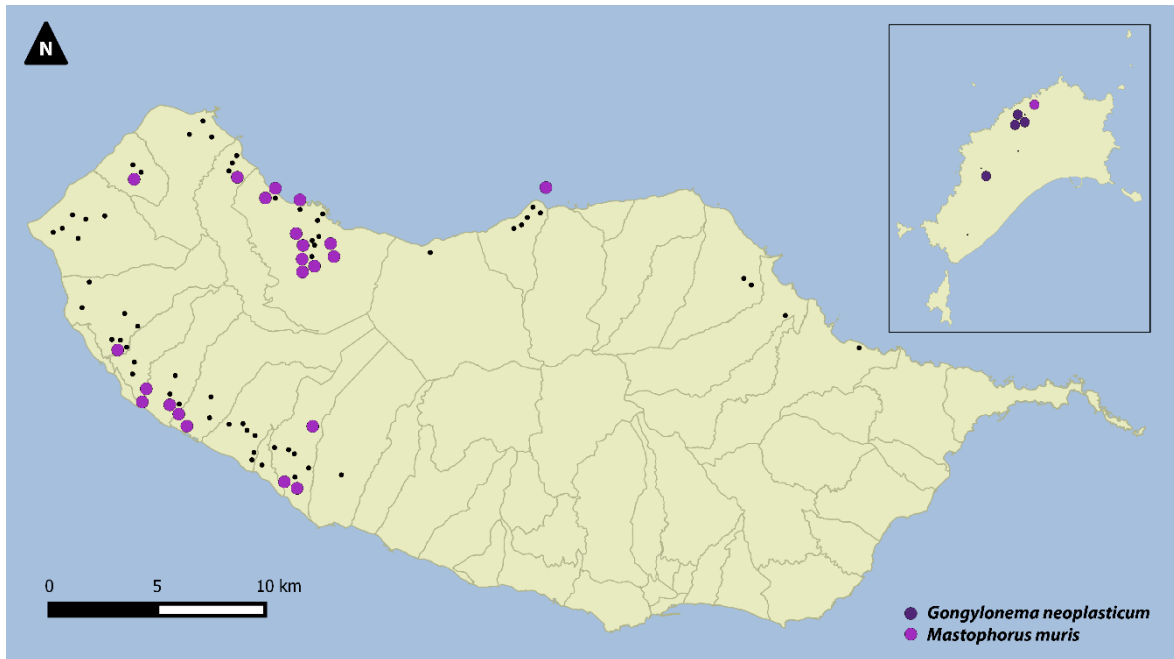
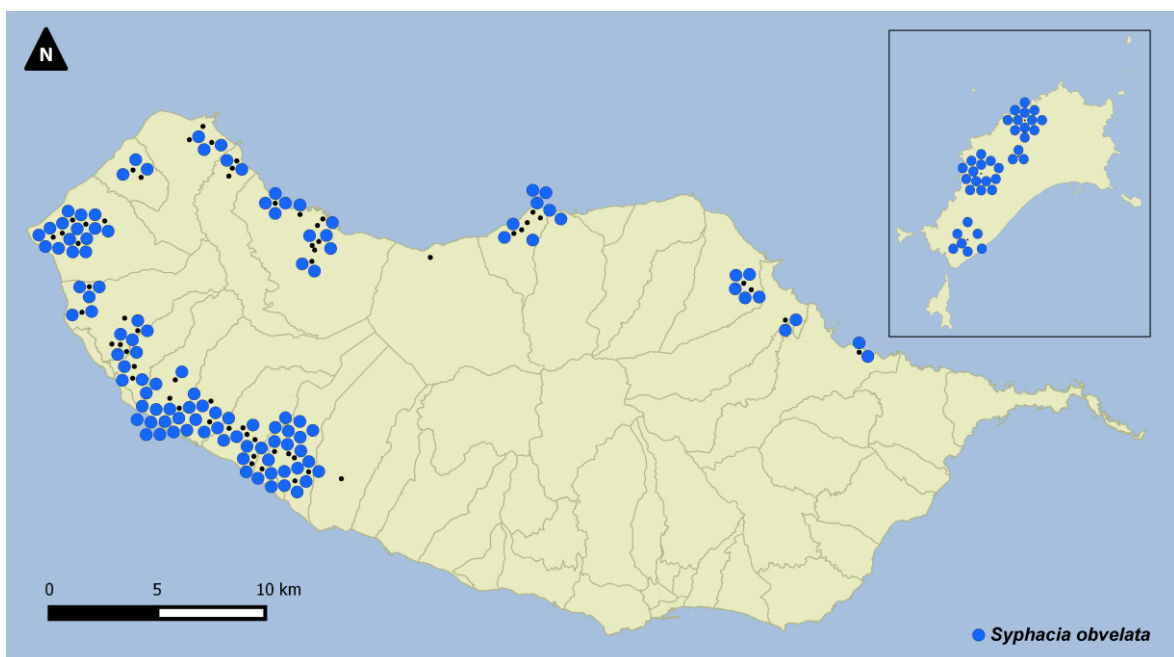
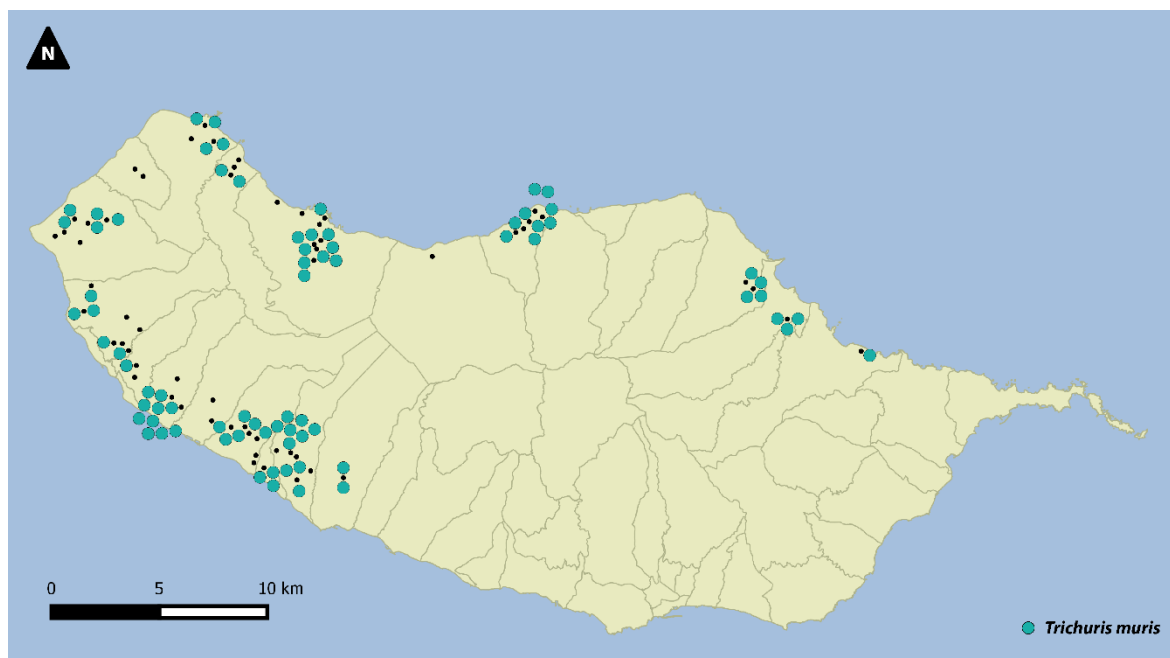


Figura 37 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por *Syphacia obvelata* nas ilhas da Madeira e de Porto Santo.



O nemátode *Trichuris muris* foi identificado apenas na ilha da Madeira tanto na vertente norte como na vertente sudoeste, sendo o parasita com prevalência mais elevada a seguir a *Syphacia obvelata* (Figura 38).

Figura 38 – Distribuição dos ratinhos em função do parasitismo por *Trichuris muris* na ilha da Madeira.



## 3.2. Discussão dos Resultados

### 3.2.1. Importância do estudo parasitológico no ratinho-caseiro

A pesquisa de parasitas em ratinhos permite a elaboração de estudos biológicos qualitativos com vista à análise da história natural de micro e macroparasitas, a determinação do potencial de uma doença no controlo de populações de campo assim como se o agente patogénico cumpre os requisitos para ser usado em controlo biológico, permitindo ainda a identificação de agentes parasitários zoonóticos que podem ter um forte impacto em Saúde Pública (Singleton & Krebs, 2007). Alguns estudos referem mesmo a potencial utilização do nemátode *Calodium hepaticum* como controlo populacional de roedores em altura de pragas (Singleton, Chambers & Spratt, 1995; Singleton & Chambers, 1996). Os parasitas em geral podem ser utilizados como marcadores biológicos quer como *host evolutionary prints*, informação obtida através do estudo dos parasitas presentes num determinado hospedeiro que fornece novos dados relativos à biologia evolutiva desse hospedeiro (Thomas, Verneau, Meeûs & Renaud, 1996), quer como *proxies*, denominados “artefactos vivos”, fornecendo informação relativa à genealogia e ecologia dos hospedeiros (Nieberding & Olivieri, 2006).

### 3.2.2. Composição qualitativa

No decurso deste trabalho foi identificado um total de 12 espécies parasitas, sendo que 1 pertencem à Classe Trematoda, 4 à Classe Cestoda e 7 ao Filo Nematoda. A composição parasitária entre ilhas verificou-se ser distinta, detetando-se 11 das 12 espécies identificadas na ilha da Madeira, nomeadamente: *Brachylaima* sp., *Cysticercus fasciolaris*, *Cysticercus* sp., *Hymenolepis diminuta*, *Rodentolepis nana*, *Calodium hepaticum*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Heterakis spumosa*, *Mastophorus muris*, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*. Enquanto na ilha de Porto Santo foram 6 as espécies identificadas: *Brachylaima* sp., *Cysticercus fasciolaris*, *Cysticercus* sp., *Gongylonema neoplasticum*, *Mastophorus muris* e *Syphacia obvelata*.

De acordo com a literatura consultada, este trabalho surge como sendo a primeira descrição da helmintofauna de *Mus musculus* no arquipélago da Madeira e a primeira vez que o nemátode *Heligmosomoides polygyrus* foi descrito na espécie *Mus musculus* em Portugal (Tabela 27).

Comparativamente ao território continental, a área do território insular e a distância deste ao continente parecem ser fatores determinantes na diferenciação de populações insulares (Nieberding, Morand, Libois & Michaux, 2006). Ambos estes fatores, associados à perda de diversidade genética, inerente ao fraco *pool* genético da população fundadora, determinam o nível de isolamento e conseqüentemente a taxa de diferenciação das populações insulares *versus* as continentais (Nieberding *et al.*, 2006). No caso específico das ilhas do arquipélago da Madeira, a fauna de mamíferos apresenta-se pobre em termos de riqueza específica (Jesus *et al.*, 2009). Hospedeiros que habitem ecossistemas insulares estão geralmente infetados com um reduzido número de espécies parasitárias e a prevalência e intensidade dos parasitas com transmissão direta são frequentemente superiores em populações insulares do que em populações do continente (Fromont, Morvilliers, Artois & Pontier, 2001). Estas condições inerentes aos ecossistemas insulares favorecem a adaptação das espécies parasitárias a novas espécies hospedeiras definitivas e intermediárias (Nieberding *et al.*, 2006).

Relativamente a trabalhos realizados também em *Mus musculus* nos Arquipélagos dos Açores, Canárias e em Portugal continental, verifica-se uma grande diversidade de espécies identificadas em todos estes locais, com pelo menos 26 espécies de helmintes, das quais 2 espécies da classe Trematoda, 7 da classe Cestoda, 15 do filo Nematoda e 2 do filo Acantocephala (Tabela 27). De referir que o tremátode *Brachylaima* sp., identificado neste trabalho, tinha sido igualmente identificado até à data apenas nos Açores (Casanova *et al.*, 1996). Dos céstodes identificados *C. fasciolaris* foi identificado nos quatro territórios, *H. diminuta* e *R. nana* foram identificados na Madeira, Açores e Portugal continental, enquanto outros exemplares deste género (*Cysticercus* sp.) foram, para nosso conhecimento, apenas identificados na Madeira. Relativamente aos nemátodes, *C. hepaticum* foi identificado na

Madeira, Açores e Portugal continental, *G. neoplasticum* na Madeira e Açores, *H. polygyrus*, para nosso conhecimento, apenas na Madeira, *H. spumosa*, *S. obvelata* e *T. muris* nos quatro territórios e *M. muris* na Madeira, Açores e Canárias.

Tabela 27 – Compilação das espécies de helmintes identificadas em exemplares de *Mus musculus* capturados nos Arquipélagos da Madeira, dos Açores, das Canárias e em Portugal continental.

	Arq. da Madeira			Arquipélago dos Açores				Arq. das Canárias	Portugal continental		
	Valente (2015)			Casanova <i>et al.</i> (1996)			Pereira (2009)	Feliu <i>et al.</i> (2012)	Catanho <i>et al.</i> (2003)	Crespo (2012)	
	Arq. Madeira	Porto Santo		Arq. São Miguel	Terceira	Flores	São Miguel	El Hierro	Alentejo (Grândola)	Zoo de Lisboa	
Nº total de animais (n)	200	161	39	52	11	19	22	92	173	42	50
<b>TREMATODA</b>											
<i>Brachylaima</i> sp.	X	X	X	X		X	X				
<i>Skrjabinocoelus</i> sp.				X	X						
<b>CESTODA</b>											
<i>Gladotaenia globifera</i>				X		X					
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	X	X	X	X		X		X	X		X
<i>Cysticercus</i> sp.	X	X	X								
<i>Hymenolepis diminuta</i>	X	X		X	X	X	X	X			X
<i>Hymenolepis straminea</i>				X		X					
<i>Rodentolepis microstoma</i>									X		
<i>Rodentolepis nana</i>	X	X						X		X	
<b>NEMATODA</b>											
<i>Aonchotheca annulosa</i>				X		X	X	X			
<i>Aspiculuris tetraptera</i>										X	
<i>Calodium hepaticum</i>	X	X		X	X	X	X	X			X
<i>Eucoleus gastricus</i>				X	X	X	X	X			
<i>Gongylonema neoplasticum</i>	X		X					X			
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	X	X									
<i>Heterakis spumosa</i>	X	X		X	X	X	X	X	X		X
<i>Mastophorus muris</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Nematoda sp.				X	X						
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>				X		X	X	X			X
<i>Protospirura</i> sp.									X		
<i>Rictularia</i> sp.									X		
<i>Syphacia obvelata</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
<i>Syphacia</i> sp.										X	
<i>Trichuris muris</i>	X	X		X	X			X	X		X
<b>ACANTHOCEPHALA</b>											
<i>Prosthorhynchus cylindraceus</i> (larva)									X		
<i>Prosthorhynchus</i> sp.				X			X				

Arq.: Arquipélago; X: parasita identificado nesse local.

Ao nível da nematofauna da Madeira, o isolamento geográfico do arquipélago, juntamente com alguns mecanismos de dispersão de nemátodes e outros ligados aos *habitats* dos organismos endémicos, aos quais os nemátodes se encontram intimamente associados, poderão conduzir ao isolamento e especiação destes (Borges *et al.*, 2008).

### 3.2.3. Composição quantitativa

O tremátode *Brachylaima* sp. foi identificado em ambas as ilhas, apresentando prevalências de 0,6% para a ilha da Madeira e 7,7% para a ilha de Porto Santo, esta última superior aos valores descritos no estudo de Casanova *et al.* (1996) para as ilhas Terceira e Flores do arquipélago dos Açores. A maioria das espécies de moluscos terrestres descritas como hospedeiros intermediários primários e secundários de *Brachylaima* sp. encontram-se presentes em ambas as ilhas, contudo a ilha de Porto Santo apresenta um maior número de espécies e subespécies de moluscos terrestres por unidade de área (Borges *et al.*, 2008). Adicionalmente, a escassa vegetação presente nesta ilha poderá levar a que o ratinho-caseiro direcione a sua alimentação para outros elementos, como invertebrados e consequentemente moluscos (Bomford, 1987; Wanless *et al.*, 2007), podendo explicar a maior prevalência de *Brachylaima* sp. nesta ilha relativamente à da Madeira.

Os céstodes *Hymenolepis diminuta* e *Rodentolepis nana*, apresentaram ambos prevalências muito inferiores (0,5% e 2,5% respetivamente) a estudos semelhantes realizados em *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* nos Açores e em Portugal Continental (Afonso-Roque *et al.*, 1984; Pereira, 2009; Crespo, 2012), sendo que estes foram somente identificados em exemplares da ilha da Madeira. Apesar de não ter sido possível a contagem de indivíduos de *R. nana* dadas as suas pequenas dimensões, fragilidade do estróbilo e fixação do rostelo à mucosa intestinal, verificou-se que este parasita parece constituir infeções de intensidades elevadas. Esta situação poderá dever-se ao seu ciclo biológico particular, que para além da possibilidade de transmissão indireta (típica de céstodes), possui também a capacidade de transmissão direta e de autoinfeção (Urquhart *et al.*, 1996; Baker, 2007; Newcomer & Fox, 2007; CDC, 2013; Bowman, 2014) facilitando a acumulação de vários indivíduos desta espécie no mesmo hospedeiro, atingindo assim elevadas intensidades de infeção.

Já no caso do céstode hepático *Cysticercus fasciolaris*, forma larvar da *Taenia taeniaeformis*, verificaram-se prevalências superiores para ambas as ilhas em comparação com trabalhos anteriores (Afonso-Roque *et al.*, 1984; Pereira, 2009; Crespo, 2012).

O nemátode hepático *Calodium hepaticum* foi apenas identificado na ilha da Madeira apresentando prevalências de 23,5% para o arquipélago e de 29,2% para a ilha da Madeira, valores ligeiramente inferiores aos descritos noutros estudos nos Açores e Portugal continental (Afonso-Roque *et al.*, 1984; Casanova *et al.*, 1996; Pereira, 2009; Crespo, 2012) mas ainda assim alarmantes dado o seu potencial zoonótico. A ausência de identificação desta espécie em Porto Santo poderá dever-se à separação geográfica entre ilhas, a não

introdução de hospedeiros infetados nesse território ou a ausência de condições geoclimáticas favoráveis ao desenvolvimento do seu ciclo biológico (Figura 2) (Spratt & Singleton, 1987).

Relativamente ao nemátode *Gongylonema neoplasticum*, este foi apenas identificado na ilha de Porto Santo apresentando-se com uma prevalência de 2,0% no arquipélago da Madeira e de 10,3% na ilha de Porto Santo, ambos os valores superiores a valores obtidos anteriormente por outros autores na ilha de São Miguel (Pereira, 2009) e em Lisboa (Afonso-Roque *et al.*, 1984; Crespo, 2012). Apesar de não ter sido identificado na ilha da Madeira, alguns dos artrópodes coprófagos que desempenham o papel de hospedeiros intermediários no seu ciclo biológico estão descritos como fazendo parte da fauna desta ilha (Borges *et al.*, 2008), pelo que é possível a presença deste parasita ainda que não tenha sido assinalado neste trabalho. O nemátode *Heligmosomoides polygyrus* apresentou prevalências de 6,5% para o Arquipélago e 8,1% para a ilha da Madeira, única ilha onde foi identificado, sendo estes valores superiores aos referidos por Afonso-Roque *et al.* (1984) para *Rattus norvegicus*. A ausência de identificação do parasita *H. polygyrus* em Porto Santo poderá dever-se à sua não introdução nesta ilha ou no caso desta se ter verificado, o parasita não ter encontrado condições favoráveis ao desenvolvimento do seu ciclo biológico, devido à aridez desta área insular (Singleton & Krebs, 2007).

Igualmente, o nemátode *Heterakis spumosa* foi apenas identificado na ilha da Madeira e apresentou prevalências intermédias relativamente a trabalhos realizados em *Mus musculus* (Pereira, 2009; Crespo, 2012), e inferiores a trabalhos realizados em *Rattus norvegicus* (Afonso-Roque, 1984; Crespo, 2012). Segundo Baker (2007), *H. spumosa* é um parasita natural e comum em ratazanas (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*), podendo no entanto parasitar espécies de ratinho como o ratinho-caseiro.

O nemátode com localização gástrica, *Mastophorus muris*, foi identificado em ambas as ilhas apresentando prevalências intermédias para a ilha da Madeira e Porto Santo, respetivamente 13,7% e 2,6%, relativamente às verificadas noutros estudos, como por exemplo, nas ilhas do arquipélago dos Açores (Casanova *et al.*, 1996; Pereira, 2009).

O oxiurídeo *Syphacia obvelata* foi o parasita que exibiu as prevalências mais elevadas para o arquipélago (73,5%), para a ilha da Madeira (68,9%) e para Porto Santo (92,3%), apresentando valores superiores aos descritos noutros trabalhos realizados em *M. musculus* (Casanova *et al.*, 1996; Pereira, 2009; Crespo, 2012). Esta espécie de nemátode é uma das mais comuns em colónias de ratinho-caseiro, quer na natureza, quer em laboratório (Taffs, 1976; Baker, 2007).

De igual modo, o nemátode *Trichuris muris* foi o segundo parasita que apresentou prevalências mais elevadas no arquipélago (39%) e na ilha da Madeira (48,4%), não tendo sido identificado na ilha de Porto Santo. Tanto os valores obtidos no arquipélago como os

valores particulares da ilha da Madeira se revelaram serem muito superiores relativamente aos estudos supracitados, atingindo em alguns dos casos valores dez vezes superiores.

### **3.2.3.1. Influência do sexo do hospedeiro**

A análise dos resultados em função do sexo do hospedeiro permitiu verificar que este fator não parece influenciar os valores de prevalência da maioria das espécies de parasitas identificadas, à exceção dos nemátodes *Heligmosomoides polygyrus* e *Syphacia obvelata*.

No caso de *H. polygyrus* verificou-se que, apesar de apresentar uma pequena proporção de animais positivos a este parasita, as fêmeas exibiam uma prevalência mais elevada (13,7%) relativamente aos machos (3,4%). Contudo, este parasita foi somente identificado em exemplares capturados em duas localizações distintas na ilha da Madeira (Figura 35) verificando-se ainda que fora efetuada a captura de apenas 16 ratinhos nessas mesmas localizações, num total de 5 machos e 11 fêmeas. A diferença no número de animais capturados de cada sexo e a localização geográfica restrita deste nemátode explicam a rejeição da diferença de prevalências observada que, apesar de estatisticamente significativa, se revelou ser insignificante à luz da interpretação de outros elementos. Relativamente ao oxiurídeo *S. obvelata*, quer para os valores totais do arquipélago quer para o caso particular da ilha da Madeira, verificou-se que os machos apresentaram uma prevalência mais elevada (78,9% e 76,1% respetivamente) relativamente às fêmeas (66,3% e 60,3% respetivamente), situação esta também retratada por Taffs (1976).

As análises possíveis das intensidades em função do sexo revelaram que este fator não influencia a carga parasitária entre machos e fêmeas. De igual modo, o tipo de infeção (simples ou mista) não variou significativamente entre os dois sexos (Figura 23).

### **3.2.3.2. Influência da idade do hospedeiro**

Após o estudo dos resultados em função da faixa etária dos animais foi possível verificar que os juvenis apresentavam menor riqueza específica que os adultos e que no caso dos nemátodes *Calodium hepaticum* e *Trichuris muris*, a diferença entre prevalências revelou ser estatisticamente significativa, quer para os valores do total do arquipélago, quer para a ilha da Madeira, única ilha onde foram identificados.

No caso dos ratinhos positivos a *Calodium hepaticum* observou-se que os adultos apresentaram uma prevalência mais elevada (33,6%) relativamente aos juvenis (4,5%), verificando-se no caso de *Trichuris muris* a mesma tendência, com os adultos a apresentarem uma prevalência superior (53,3%) em relação aos juvenis (18,2%). Tendo em conta o seu desenvolvimento, as crias de ratinho-caseiro tornam-se independentes dos progenitores cerca das três semanas de vida, atingindo a maturidade sexual por volta das seis semanas de idade, no caso das fêmeas, e das oito semanas de idade no caso dos machos (Berry, 1970; Mathias, 1999). Assim, a prevalência superior verificada para *C. hepaticum* e *T. muris* em adultos

relativamente aos juvenis pode ser explicada pelo maior tempo de exposição dos animais mais velhos e pelo seu comportamento exploratório e de predação que adquirem com a maturidade sexual, aumentando desta forma o seu risco de infeção. Apesar dos juvenis iniciarem o contacto com o exterior do ninho por volta das três semanas de idade, estes apresentam menor tempo de exposição a alimentos e objetos (fómites) capazes de alojar e transmitir agentes patogénicos potencialmente contaminados por exemplo, com ovos de *C. hepaticum* e *T. muris*. A infeção é, no entanto, facilitada pelo modo de disseminação (ciclo de vida direto), resistência destes agentes no meio ambiente e pelo comportamento curioso inerente a esta espécie roedora (Spratt & Singleton, 2001; Baker, 2007; Singleton & Krebs, 2007; Bowman, 2014). O estudo do tipo de infeção em função da idade do hospedeiro revelou ainda que os adultos estão tendencialmente infetados com mais do que uma espécie parasita relativamente aos juvenis (Tabela 26). Esta situação pode ser igualmente explicada pelo maior tempo de exposição dos adultos a alimento, água e solo contaminados, facilitando a infeção, quer esta seja simples ou por um maior número de espécies parasitas, num processo cumulativo ao longo do tempo.

No caso do nemátode *Syphacia obvelata*, as fêmeas migram até à região perianal onde depositam os seus ovos, cujas larvas, no seu interior, eclodem poucas horas depois, podendo migrar do ânus para o cólon do próprio animal (retroinfeção) (Taffs, 1976). Perante esta situação e a curta duração do período pré-patente, é natural que as crias se infetem nas primeiras semanas de vida, quer por contacto direto com a região perianal da progenitora, quer indiretamente por ingestão de materiais, alimentos ou águas contaminados no interior das tocas, podendo assim explicar o facto dos juvenis estarem igualmente parasitados em relação aos adultos.

### **3.2.3.3. Caso particular dos hospedeiros infetados por *Calodium hepaticum***

Este nemátode com localização hepática foi identificado apenas na ilha da Madeira, num total de 47 ratinhos. A infeção grave revelou ser a intensidade de infeção de maior prevalência. Elevadas cargas parasitárias levam a lesões hepáticas graves, no entanto muitos animais sobrevivem sem indícios de falência hepática e/ou morte, havendo contudo, uma diminuição da taxa de sobrevivência em cerca de 5 a 10% (Resendes *et al.*, 2009; Fuehrer, 2014a).

Apesar de não se ter verificado influência do sexo na prevalência de *C. hepaticum* em machos e fêmeas infetados, as fêmeas apresentam um maior número de infeções de intensidade mais grave que os machos (Figura 29), situação que pode ser explicada pela morfologia, estatuto fisiológico e imunológico da fêmea como, por exemplo, situações de gestação ou galactopoiese, potencialmente imunodepressoras e associadas a carências nutricionais, como aliás está registado noutros mamíferos domésticos e silvestres, assim como comportamentos sociais, nomeadamente a procura de elementos do ambiente,

potencialmente contaminados, para construção do ninho (MacDonald & Barrett, 1993; Poulin, 1996).

Relativamente ao estudo da intensidade de infeção em função da faixa etária (Figura 30), verificou-se que 32 animais adultos se apresentavam com uma infeção de intensidade grave, 7 com infeção moderada e 7 com infeção leve enquanto nos juvenis, apenas 1 animal se encontrava infetado com *C. hepaticum* apresentando uma infeção grave. O facto dos animais adultos apresentarem uma prevalência mais elevada para *C. hepaticum* pode dever-se ao maior tempo de exposição, diretamente proporcional à idade, a alimento, água e solo contaminados, facilitando a sua infeção. Curiosamente a prevalência baixa na faixa etária dos juvenis pode dever-se à baixa taxa de sobrevivência consequente do sistema imunitário ainda pouco desenvolvido, situação que explica a presença de apenas um animal jovem positivo a *C. hepaticum* e com uma infeção de grave intensidade (Singleton & Chambers, 1996).

#### **3.2.3.4. Distribuição da infeção por localização geográfica do hospedeiro**

Ao analisar os mapas de distribuição dos ratinhos em função do seu parasitismo total e em função de cada espécie parasita, verifica-se que existem diferenças no número de espécies presentes em cada uma das ilhas, com *Brachylaima* sp., *Cysticercus fasciolaris*, *Cysticercus* sp., *Hymenolepis diminuta*, *Rodentolepis nana*, *Calodium hepaticum*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Heterakis spumosa*, *Mastophorus muris*, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris* na ilha da Madeira e *Brachylaima* sp., *Cysticercus fasciolaris*, *Cysticercus* sp., *Gongylonema neoplasticum*, *Mastophorus muris* e *Syphacia obvelata* na ilha de Porto Santo. Esta diferença na composição parasitária poderá dever-se ao isolamento geográfico dos dois territórios insulares (Figura 1), pela diferença de climas nas duas ilhas (Figura 2) e pelas diferenças nas populações fundadoras de cada ilha (Fromont *et al.*, 2001; Nieberding *et al.*, 2006; Jesus *et al.*, 2009).

#### **3.2.4. Papel do ratinho-caseiro como transmissor de potenciais doenças zoonóticas**

As populações comensais de ratinho-caseiro, próximas a populações humanas, apresentam densidades bastante mais elevadas do que as populações selvagens (Mathias, 1999).

A capacidade de saltar, escalar, nadar e passar por orifícios pequenos faz com que estes animais estejam perfeitamente adaptados a uma existência comensal associada a populações humanas (Singleton & Krebs, 2007). Estes roedores ocupam *habitats*, desde regiões tropicais a subantárticas, e apesar das temperaturas extremas que se fazem sentir nestes locais, a reprodução do ratinho-caseiro não parece ser afetada, desde que haja disponibilidade de alimento com qualidade (Singleton & Krebs, 2007). Esta capacidade de adaptação a climas extremos tem permitido a subsistência destes animais em locais de proximidade a populações

humanas com baixas temperaturas, como armazéns de frio e em locais com temperaturas mais altas, como estábulos e indústrias.

O ratinho-caseiro é um animal naturalmente curioso, explorando facilmente novos objetos (neofilia), ao contrário do que acontece com outras espécies comensais, como a ratazana-castanha (*Rattus norvegicus*) (Singleton & Krebs, 2007). Este comportamento facilita a invasão de novos ambientes e a contaminação de locais, objetos e géneros alimentícios com as fezes, que podem atingir uma frequência superior a 50 excrementos/dia, e urina destes animais (MacDonald & Barrett, 1993). Igualmente, a baixa presença de predadores naturais no arquipélago da Madeira (Jesus *et al.*, 2009), variações na ocupação humana do território, juntamente com alterações climáticas facilitam o aumento da densidade populacional e a proliferação deste roedor, bem como podem levar ao aparecimento e/ou aumento de doenças transmitidas por roedores, uma vez que os vetores, hospedeiros intermediários e definitivos, e os próprios roedores, podem ser influenciados por estas variações (Githeko *et al.*, 2000).

Os roedores em geral são considerados espécies reservatórias de zoonoses com um importante impacto em Saúde Pública e Animal (Singleton & Krebs, 2007; Froeschke & Matthee, 2014). No caso particular do ratinho-caseiro, dos vários helmintes registados neste pequeno roedor, pelo menos sete foram reportados como causas de infeção em humanos, de referir *Calodium hepaticum*, *Rodentolepis nana* e *Brachylaima cribbi* (Singleton & Krebs, 2007). Dos doze helmintes identificados neste trabalho, três céstodes, *Cysticercus fasciolaris* (forma larvar da *Taenia taeniaeformis*), *Hymenolepis diminuta* e *Rodentolepis nana* e o nemátode *Calodium hepaticum* são conhecidos agentes zoonóticos cujos ciclos biológicos, de alguns destes, podem envolver carnívoros domésticos próximos ao Homem, amplificando o risco de transmissão destes agentes. O tremátode *Brachylaima* sp. e o nemátode *Syphacia obvelata*, possuem um potencial zoonótico devido aos seus ciclos biológicos, podendo constituir agentes zoonóticos (Baker, 2007; Singleton & Krebs, 2007; Meerburg *et al.*, 2009; Froeschke & Matthee, 2014).

#### 4. Conclusões

Neste trabalho foram identificadas um total de 12 espécies de helmintes nos exemplares capturados nas ilhas da Madeira e Porto Santo do arquipélago da Madeira, 1 espécie da classe Trematoda (*Brachylaima* sp.), 4 espécies da classe Cestoda (*Cysticercus fasciolaris*, *Cysticercus* sp., *Hymenolepis diminuta* e *Rodentolepis nana*) e 7 espécies do filo Nematoda (*Calodium hepaticum*, *Gongylophora neoplasticum*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Heterakis spumosa*, *Mastophorus muris*, *Syphacia obvelata* e *Trichuris muris*).

A análise dos resultados em função do sexo dos exemplares capturados permitiu verificar que este fator não influencia significativamente o parasitismo entre machos e fêmeas para a maioria das espécies identificadas. Verificou-se contudo, que no caso de *Syphacia obvelata* os machos apresentaram um maior número de animais infetados que fêmeas. No caso de *Calodium hepaticum*, apesar de ambos os sexos se apresentarem parasitados de igual forma, as fêmeas revelaram ter infeções mais graves que os machos.

A análise dos resultados em função da idade dos exemplares capturados permitiu verificar diferenças na composição parasitária entre juvenis e adultos, sendo que estes últimos apresentaram-se parasitados com um maior número de espécies devido ao maior tempo de exposição á infecção. Foi ainda possível verificar que o grupo dos adultos apresentava um maior número de indivíduos parasitados por *Calodium hepaticum* e *Trichuris muris* relativamente aos juvenis.

Tendo em conta a localização próxima dos pontos de captura a populações humanas, a presença destes parasitas em roedores comensais (neste caso *Mus musculus domesticus*), e a sua forte associação ao Homem, a transmissão de tais agentes a estas populações está altamente facilitada.

Das 12 espécies de helmintes identificadas, *Cysticercus fasciolaris*, *Hymenolepis diminuta*, *Rodentolepis nana* e *Calodium hepaticum* estão descritas como zoonoses, e *Syphacia obvelata* e possivelmente *Brachylaima* sp. com potencial zoonótico. Das espécies identificadas algumas apresentam ciclos de vida diretos (*C. hepaticum* e *S. obvelata*), indiretos (*Brachylaima* sp., *C. fasciolaris* e *H. diminuta*), algumas conseguem ambas as vias de transmissão e autoinfeção (*R. nana*), que juntamente com a capacidade de persistirem no ambiente, em água e alimentos, nomeadamente *C. hepaticum*, fazem destes parasitas potenciais problemas com impacto em Saúde Pública, nomeadamente pelo fácil acesso e contacto com populações humanas, devido à sua ocupação profissional em ecossistemas agro-rurais.

A baixa especificidade para hospedeiros definitivos e intermediários em algumas destas espécies fez com que tenham conseguido adaptar-se a várias espécies domésticas em proximidade com populações humanas, espécies pecuárias e espécies da fauna selvagem. Desta forma, o aprofundamento do estudo do impacto dos parasitas de *Mus musculus domesticus* no arquipélago da Madeira carece de uma abordagem integrada e multidisciplinar

atendendo às suas repercussões na Saúde Animal, Humana e dos Ecossistemas, vocacionada para analisar as suas consequências na perspectiva de *One Health*.

## 5. Bibliografia

- Adler, G.H. & Levins, R. (1994). The Island Syndrome in Rodent Populations. *The Quarterly Review of Biology*, 69, 473-490.
- Afonso-Roque, M.M., Mendonça, M.M., Marcos, M.V. & Lopes, F.J. (1984). Endoparasitas encontrados no rato cinzento (*Rattus norvegicus* Berk.): a Zona de Lisboa. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, Vol. VII.
- Afonso-Roque, M.M. (1989). *Fauna helmintológica de vertebrados terrestres da ilha de S. Miguel (Açores)*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Centro de Zoologia, Investigação Científica Tropical.
- Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal (2011). *Atlas climático dos Arquipélagos das Canárias, da Madeira e dos Açores: temperatura do ar e precipitação (1971-2000)*. Acedido em Jul. 16, 2015, disponível em: <http://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/publicacoes/atlas.clima.ilhas.iberico.2011.pdf>
- Al-Jashamy, K. (2010). Scanning Electron Microscopy and Histological Morphology of *Cysticercus fasciolaris*, which induced Fibrosarcomas in Laboratory Rats. *Annals of Microscopy*, 10, 44-48.
- Allen, J.D. & Esquela-Kerscher (2013). Short report: *Gongylonema pulchrum* infection in a resident of Williamsburg, Virginia, verified by genetic analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(4), 755-757.
- Anderson, R.C. (2000). *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission*. (2nd ed.). Wallingford: CABI Publishing.
- Andreassen, J., Bennet-Jenkins, E.M. & Bryant., C. (1999). Immunology and Biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. *Advances in Parasitology*, 42, 223-275.
- Ayala, M.A. & Yench, M.W. (2012). *Gongylonema*: A Parasitic Nematode of the Oral Cavity. *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery*, 138(11), 1082-1084.
- Azevedo, V. (2013). Vikings chegaram à Madeira e aos Açores antes dos portugueses. *Expresso*. Acedido em Jul. 29, 2015, disponível em: <http://expresso.sapo.pt/sociedade/vikings-chegaram-a-madeira-e-aos-acores-antes-dos-portugueses=f841293>
- Baker, D.G. (2007). *Flynn's Parasites of Laboratory Animals*. (2nd ed.). Iowa: Blackwell Publishing Professional, Blackwell Publishing.
- Bansemir, A.D. & Sukhdeo, M. (1994). The food resource of adult *Heligmosomoides polygyrus* in the small intestine. *Journal of Parasitology*, 80(1), 24-28.
- Battersby, S., Hirschhorn, R.B. & Amman, B.R. (2008). Commensal rodents. In Bonnefoy, X., Kampen, H. & Sweeney, K. (Eds.), *Public Health Significance of Urban Pests*. (pp. 387-419). Copenhagen, Denmark: World Health Organization Regional Office for Europe.
- Berry, R.J. (1970). The Natural History of the House Mouse. *Field Studies Journal*, 3, 219-262.
- Bidaisee, S. & Macpherson, C.N.L. (2014). Zoonoses and One Health: A Review of the Literature. *Journal of Parasitology Research*, 2014, 1-8.

- Bomford, M. (1987). Food and Reproduction of Wild House Mice I. Diet and Breeding Seasons in Various Habitats on Irrigated Cereal Farms in New South Wales. *Australian Wildlife Research*, 14, 183-196.
- Borges, P.A.V., Abreu, C., Aguiar, A.M.F., Carvalho, P., Jardim, R., Melo, I., Oliveira, P., Sérgio, C., Serrano, A.R.M. & Vieira, P. (Eds.) (2008). *A list of the terrestrial fungi, flora and fauna of Madeira and Selvagens archipelagos*. Direcção Regional do Ambiente da Madeira and Universidade dos Açores, Funchal and Angra do Heroísmo, 440 pp.
- Bowman, D.D. (2014). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. (10<sup>th</sup> ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Bush, A.O., Aho, J.M. & Kennedy, C.R. (1990). Ecological versus phylogenetic determinants of helminth parasite community richness. *Evolutionary Ecology*, 4, 1-20.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. & Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *The Journal of Parasitology*, 83(4), 575-583.
- Butcher, A.R., Talbot, G.A., Norton, R.E., Kirk, M.D., Cribb, T.H., Forsyth, J.R., Knight, B. & Cameron, A.S. (1996). Locally acquired *Brachylaima* sp. (Digenea: Brachylaimidae) intestinal fluke infection in two South Australian infants. *The Medical Journal of Australia*, 164(8), 475-478.
- Butcher, A.R., Parasuramar, P., Thompson, C.S. & Grove, D.I. (1998). First report of the isolation of an adult worm of the genus *Brachylaima* (Digenea: Brachylaimidae), from the gastrointestinal tract of a human. *International Journal for Parasitology*, 28, 607-610.
- Butcher, A.R. & Grove, D.I. (2001). Description of the life-cycle stages of *Brachylaima cribbi* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) derived from eggs recovered from human faeces in Australia. *Systematic Parasitology*, 49, 211-221.
- Butcher, A.R., Brealey, J.K., Grove D.I. & Dymock, R.B. (2002). *Brachylaima cribbi* (Digenea: Brachylaimidae): scanning electron microscopical observations of the life-cycle stages. *Journal of Helminthology*, 76, 207-215.
- Cabrita, J.A.M. (2004). *Sifonápteros e Ixodídeos de Mamíferos na Ilha do Porto Santo: Um Contributo Para o seu Melhor Conhecimento*. Tese de Doutoramento. Funchal: Departamento de Biologia, Universidade da Madeira.
- Câmara Municipal de Porto Santo (2014). *Porto Santo: Ilha*. Acedido em Jul. 28, 2015, disponível em: <http://www.cm-portosanto.pt/porto-santo/ilha/>
- Camargo, L.M.A., Camargo, J.S.A.A., Vera, L.J.S., Barreto, P.T.C., Tourinho, E.K. & Souza, M.M. (2010). Capillariasis (Trichurida, Trichinellidae, *Capillaria hepatica*) in the Brazilian Amazon: low pathogenicity, low infectivity and a novel mode of transmission. *Parasites & Vectors*, 3:11.
- Campillo, M.C., Vázquez, F.A.R., Fernández, A.R.M., Afonso-Roque, M.M., Cecilia, R.A., Pellitero, M.P.A., Garrido, J.A. & Carretero, R.C. (1980). *Índice-catálogo de Zoonosomas Ibéricos*. Madrid: Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Seguridad Social.
- Capelo, J. (Ed.), Aguiar, C., Costa, J.C., Fontinha, S., Espírito-Santo, D., Jardim, R., Lousã, M., Martinez-Rivas, S., Mesquita, S., Sequeira, M. & Sousa, J. (2004). A paisagem vegetal da Ilha da Madeira. Associação Lusitana de Fitossociologia, *Quercetea*, 6, 3-200.

- Casanova, J.C., Miquel, J., Fons, R., Molina, X., Feliu, C., Mathias, M.L., Torres, J., Libois, R., Santos-Reis, M., Collares-Pereira, M. & Marchand, B. (1996). On the helminthfauna of wild mammals (Rodentia, Insectivora and Lagomorpha) in Azores Archipelago (Portugal). *Vie et Milieu*, 46, 253-259.
- Catanho, H., Fonseca, I.M.P., Mathias, M.L., Lima, S.C., Carvalho, L.M.M., Sousa, C.B., Afonso-Roque, M.M., Rosário, V. & Fazendeiro, I. (2003). Estudo comparativo da fauna parasitológica de uma população de ratinho-caseiro (*Mus domesticus*) e de ratinho-ruivo (*Mus spretus*) do concelho de Grândola (Alentejo, Portugal). Resultados Preliminares. *Ata Parasitológica Portuguesa*, 10 (1), p. 52.
- Centers for Disease Control and Prevention (2011). *Diseases from rodents: Diseases directly transmitted by rodents*. Acedido em Ago. 3, 2015, disponível em: <http://www.cdc.gov/rodents/diseases/direct.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (2012). *Diseases from rodents: Diseases indirectly transmitted by rodents*. Acedido em Ago. 3, 2015, disponível em: <http://www.cdc.gov/rodents/diseases/indirect.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (2013a). *Hymenolepiasis: Hymenolepis diminuta; Hymenolepis nana*. Acedido em Ago. 13, 2015, disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (2013b). *DPDx – Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern*. Acedido em Set. 18, 2015, disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>
- Chabaud, A.G. (1975). No. 3. Keys to Genera of the Order Spirurida: Part 2. Spiruroidea, Habronematoidea and Acuaroidea. In R.C. Anderson, A.G. Chabaud & S. Willmott (Eds.), *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. (pp. 30). Farnham Royal, Bucks, U.K.: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Chabaud, A.G. (1978). No. 6. Keys to Genera of the Superfamilies Cosmocercoidea, Seuratoidea, Heterakoidea and Subuluroidea. In R.C. Anderson, A.G. Chabaud & S. Willmott (Eds.), *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. (pp. 71). Farnham Royal, Bucks, U.K.: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Comissão Nacional da UNESCO (n.d.). *Património Mundial em Portugal – Floresta Laurissilva na Madeira*. Acedido em Ago. 1, 2015, disponível em: <https://www.unescoportugal.mne.pt/pt/temas/proteger-o-nosso-patrimonio-e-promover-a-criatividade/patrimonio-mundial-em-portugal/floresta-laurissilva-na-madeira>
- Conlogue, G., Foreyt, W., Adess, M. & Levine, H. (1979). *Capillaria hepatica* (Bancroft) in select rat populations of Hartford, Connecticut, with possible Public Health implications. *The Journal of Parasitology*, 65(1), 105-108.
- Correia, J., Noiva, R., Pissarra, H., Fernandes, T., Bernardino, R., Carvalho, L.M., Afonso, F. & Peleteiro, C. (2011). Four cases of *Calodium hepaticum* infection in non-human primates from the Lisbon Zoological Garden, Portugal. *Proceedings of the International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals 2011*, Lisbon, 13-22.
- Crespo, A.P.M.A.M. (2012). *Controlo de pragas no Jardim Zoológico de Lisboa – particular relevância para o controlo de roedores e sua infeção parasitária*. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

- Cribb, T.H. (1990). Introduction of a *Brachylaima* species (Digenea: Brachylaimidae) to Australia. *International Journal for Parasitology*, 20, 789-796.
- Cribb, T.H. (1992). The Brachylaimidae (Trematoda: Digenea) of Australian native mammals and birds, including descriptions of *Dasyurotrema* n. g. and four new species of *Brachylaima*. *Systematic Parasitology*, 22, 45-72.
- Cribb, T.H. & O'Callaghan, M. (1992). An unusual trematode infecting domestic chickens. *Australian Veterinary Journal*, 69, 69-70.
- Crompton, D.W.T. (1999). How much Human Helminthiasis is there in the World? *The Journal of Parasitology*, 85(3), 397-403.
- Crowcroft, P. & Rowe, F.P. (1961). The weights of wild house mice (*Mus musculus* L.) living in confined colonies. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 136(2), 177-185.
- Cucchi, T., Auffray, J-C. & Vigne, J-D. (2012). On the origin of the house mouse synanthropy and dispersal in the Near East and Europe: zooarchaeological review and perspectives. In: Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., & Piálek J. *Evolution of the House Mouse*. Cambridge: Cambridge University Press. 67–93.
- Dailey, M.D. (1996). *Meyer, Olsen & Schmidt's Essentials of Parasitology*. (6th ed.). Dubuque, Iowa, USA: Wm. C. Brown Publishers, A Times Mirror Company.
- Direção Regional de Estatística da Madeira (2014). *Madeira em Números: 2013*. Funchal, Portugal. Acedido em Jul. 28, 2015, disponível em: <http://estatistica.gov-madeira.pt>
- Direção Regional de Estatística da Madeira (2015). *Série Retrospectiva das Estatísticas do Ambiente da Região Autónoma da Madeira (1989-2013)*. Funchal, Portugal. Acedido em Jul. 28, 2015, disponível em: <http://estatistica.gov-madeira.pt>
- Dunn, A.M. (Ed.). (1983). *Helminthología Veterinaria*. (2nd ed.) México: El Manual Moderno.
- Durette-Desset, M-C. (1983). No. 10. Keys to Genera of the Superfamily Trichostrongloidea. In R.C. Anderson, A.G. Chabaud & S. Willmott (Eds.), *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. (pp. 83). Farnham Royal, Bucks, U.K.: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Durette-Desset, M-C. (1985). Trichostringyloid Nematodes and Their Vertebrate Hosts: Reconstruction of the Phylogeny of a Parasitic Group. *Advances in Parasitology*, 24, 239-306
- Eberhard, M.L. & Busillo, C. (1999). Human *Gongylonema* infection in a resident of New York City. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(1), 51-52.
- Eira, C., Miquel, J., Vingada, J. & Torres, J. (2006). Natural infection of *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha, Leporidae) by *Gongylonema neoplasticum* (Nematoda, Gongylnematidae) in Portugal. *Acta Parasitologica*, 51(2), 119-122.
- Euzeby, J. (1981). *Diagnostic Expérimental des Helminthoses animals*. Livre 1: Généralités – Diagnostic direct post mortem. Paris: Informations Techniques des Services Vétérinaires
- Euzeby, J. (1982). *Diagnostic Expérimental des Helminthoses animals*. Livre 2: Diagnostic direct post mortem/Diagnostic indirect (Diagnostique biologique). Paris: Informations Techniques des Services Vétérinaires.

- Faria, B.F., Abreu, C., Aguiar, A.F., Augusto, J., Lobo, C., Jardim, R., Oliveira, P. & Teixeira, D. (2008). *A perspectiva arquipelágica: Madeira*. In: Martín, J.L, Arechavaleta, M., Borges, P.A.V. & Faria, B. (Eds.). *TOP 100 - As cem espécies ameaçadas prioritárias em termos de gestão na região europeia biogeográfica da Macaronésia*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias, pp. 451-468.
- Feliu, C., López, M., Gómez, M.S., Torres, J., Sánchez, S., Jordi, M., Abreu-Acosta, N., Segovia, J.M., Martín-Alonso, A., Montoliu, I., Villa, M., Fernández-Álvarez, A., Bakhoun, A.J.S., Valladares, B., Orós, J. & Foronda, P. (2012). Parasite fauna of rodents (Muridae) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach. *Acta Parasitologica*, 57(2), 171-178.
- Ferrari, N. (2005). *Macroparasite transmission and dynamics in Apodemus flavicollis*. Ph.D. Thesis. Stirling: Department of Biological and Environmental Sciences, University of Stirling.
- Fibiger, J.A.G. & Ditlevsen, H. (1914). A contribution to the biology and morphology of *Spiroptera* (*Gongylonema*) *neoplastica* n. sp.. *Mindeskript I Anledning af Hundredaaret*, København, 25, pp. 28.
- Fontinha, S.M. (2004). *A Laurissilva da Madeira, Património da Humanidade: a Investigação Científica e a Conservação*. IX Jornadas de Urdaibai sobre Desarrollo Sostenible, Patrimonio Cultural, Bilbao.
- Forrester, D.J. (1971). *Heligmosomoides polygyrus* (= *Nematospiroides dubius*) from wild rodents of northern California: natural infections, host specificity, and strain characteristics. *The Journal of Parasitology*, 57(3), 498-503.
- França, J.A.P. & Almeida, A.B. (2003). Plano Regional de Água da Madeira – Síntese do diagnóstico e dos objetivos. 6º SILUSBA – *Simpósio de Hidráulica e Recursos Hídricos dos Países de Língua Oficial Portuguesa, Cidade da Praia, República de Cabo Verde, 10-12 Novembro*.
- Froeschke, G. & Matthee, S. (2014). Landscape characteristics influence helminth infestations in a peri-domestic rodent – implications for possible zoonotic disease. *Parasites & Vectors*, 7:393.
- Fromont, E., Morvilliers, L., Artois, M. & Pontier, D. (2001). Parasite richness and abundance in insular and mainland feral cats: insularity or density? *Parasitology*, 123(2), 143-151.
- Fuehrer, H.P. (2014a). An overview of the host spectrum and distribution of *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*): part 1 – Muroidea. *Parasitology Research*, 113(2), 619-640.
- Fuehrer, H.P. (2014b). An overview of the host spectrum and distribution of *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*): part 2 – Mammalia (excluding Muroidea). *Parasitology Research*, 113(2), 641-651.
- Fugita, O., Oku, Y., Okamoto, M., Sato, H., Ooi, H.K., Kamiya, M. & Rausch, R.L. (1991). Early Development of Larval *Taenia polyacantha* in Experimental Intermediate Hosts. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 58(1), 100-109.
- Gabriel, S.I. Jóhannesdóttir, F., Jones, E.P. & Searle, J.B. (2010). Colonization, mouse-style. *BMC Biology* 2010, 8:131.
- Galvão, V.A. (1979). Tentativa para detectar infecção por *Capillaria hepatica* no Homem. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 21(5), 231-236.

- Githeko, A.K., Lindsay, S.W., Confalonieri, U.E. & Patz, J.A. (2000). Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(9), 1136-47.
- Gosling, P.J. (Ed.) (2005). *Dictionary of Parasitology*. Florida, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Gregory, R.D., Montgomery S.S.J. & Montgomery W.I. (1992). Population biology of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda) in the wood mouse. *Journal of Animal Ecology*, 61, 749-757.
- Haukisalmi, V. & Henttonen, H. (1993). Population dynamics of *Taenia polyacantha* metacestodes in the bank vole *Clethrionomys glareolus*. *Annales Zoologici Fennici*, 30, 81-84.
- Hernandez, A.D. & Sukhdeo, M.V.K. (1995). Host Grooming and the Transmission Strategy of *Heligmosomoides polygyrus*. *The Journal of Parasitology*, 81(6), 865-869.
- Hitchcock, C.R. & Bell, E.T. (1952). Studies on the nematode parasite, *Gongylonema neoplasticum* (*Spiroptera neoplasticum*) and avitaminosis A in the forestomach of rats: comparison with Fibiger's results. *Journal of the National Cancer Institute*, 12, 1345-1387.
- Howie, A. (2007). *An identification guide to the Small Mammals of Cornwall and the Isles of Scilly*. Environmental Records Centre for Cornwall and the Isles of Scilly (ERCCIS). Acedido em Jul. 28, 2015, disponível em: [http://www.erccis.org.uk/resources/species\\_and\\_id\\_guides/mammal\\_identification\\_guides](http://www.erccis.org.uk/resources/species_and_id_guides/mammal_identification_guides)
- Hurst, R.J.M. & Else, K.J. (2013). *Trichuris muris* research revisited: a journey through time. *Parasitology*, 140, 1325-1339.
- Hutchins, M., Kleiman, D.G., Geist, V. & McDade, M.C. (2003). *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. (2<sup>nd</sup> ed.), 16, Mammals V. Farmington Hills, Gale Group.
- Instituto Nacional de Estatística, I.P. (2012). *Censos 2011 Resultados Definitivos – Região Autónoma da Madeira*. Lisboa, Portugal. Acedido em Jul. 17, 2015, disponível em: <https://www.ine.pt>
- Instituto Nacional de Estatística, I.P. (2014). *Inquérito à estrutura das Explorações Agrícolas 2013*. Lisboa, Portugal. Acedido em Jul. 29, 2015, disponível em: <https://www.ine.pt>
- Ito, M. & Itagaki, T. (2003). Survey on wild rodents for endoparasites in Iwate Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65(10), 1151-1153.
- IUSS Grupo de Trabajo WRB (2007). Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007. *Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos*, 103. FAO, Roma. Acedido em Ago. 1, 2015, disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0510s.pdf>
- Jesus, J., Teixeira, S., Teixeira, D., Freitas, T. & Russo, D. (2009). *Vertebrados Terrestres Autóctones dos Arquipélagos da Madeira e Selvagens – Répteis e Mamíferos*. Coleção Biodiversidade Madeirense: Avaliação e Conservação nº6. Funchal, Direcção Regional do Ambiente.
- Jia, W., Yan, H., Lou, Z., Ni, X., Dyachenko, V., Li, H. & Littlewood, D.T.J. (2012). Mitochondrial genes and genomes support a cryptic species of tapeworm within *Taenia taeniaeformis*. *Acta Tropica*, 123, 154-163.

- Jithendran, K.P. & Somvanshi, R. (1998). Experimental infection of mice with *Taenia taeniaformis* eggs from cats – Course of infection and pathological studies. *Indian Journal of Experimental Biology*, 36, 523-525.
- Jones, E.P., Eager, H.M., Gabriel, S.I., Jóhannesdóttir, F., & Searle, J.B. (2013). Genetic tracking of mice and other bioproxies to infer human history. *Trends in Genetics*, 29, 298-308.
- Jong, Y. *et al.*, (2014). *Fauna Europaea - all European animal species on the web*. Biodiversity Data Journal 2: e4034. Acedido em Jul. 22, 2015, disponível em <http://www.faunaeur.org/>
- Juncker-Voss, M., Prosl, H., Lussy, H., Enzenberg, U., Auer, H. & Nowotny (2000). Serological Detection of *Capillaria hepatica* by Indirect Immunofluorescence Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 2000, 431-433.
- Klementowicz, J.E., Travis, M.A. & Grencis, R.K. (2012). *Trichuris muris*: a model of gastrointestinal parasite infection. *Seminars in Immunopathology*, 34, 815-828.
- Lee, T.D.G. & Wright, K.A. (1978). The morphology of the attachment and probable feeding site of the nematode *Trichuris muris* (Schrank, 1788) Hall, 1916. *Canadian Journal of Zoology*, 56(9), 1889-1905.
- López-Darias, M., Ribas, A. & Feliú, C. (2008). Helminth parasites in native and invasive mammal populations: comparative study on the Barbary ground squirrel *Atlantoxerus getulus* L. (Rodentia, Scuridae) in Morocco and the Canary Islands. *Acta Parasitologica*, 53(3), 296-301.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. & De Poorter, M. (2000). *100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A selection from the Global Invasive Species Database*. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG). Acedido em Jul. 27, 2015, disponível em: <http://www.issg.org/database/species/search.asp?s t=100ss>
- MacArthur, J.A. & Wood, M. (1978). Control of oxyurids in mice using thiabendazole. *Laboratory Animals*, 12(3), 141-143.
- MacDonald, D. & Barrett, P. (1993). *Guia FAPAS – Mamíferos de Portugal e Europa*. Porto: FAPAS e Câmara Municipal do Porto
- MacKay, J., School of Biological Sciences, University of Auckland, New Zealand & IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (2010). *100 of the World's Worst Invasive Alien Species: Mus musculus (mammal)*. Acedido em Jul. 27, 2015, disponível em: <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si= 97&fr=1&sts=&lang=EN>
- Macnish, M.G., Ryan, U.M., Behnke, J.M. & Thompson, R.C.A. (2003). Detection of the rodent tapeworm *Rodentolepis* (= *Hymenolepis*) *microstoma* in humans. A new zoonosis? *International Journal for Parasitology*, 33, 1079-1085.
- Margolis, L., Esch, G.W., Holmes, J.C., Kuris, A.M. & Schad, G.A. (1982). The use of ecological terms in parasitology (report of an Ad Hoc Committee of the American Society of Parasitologists). *The Journal of Parasitology*, 68(1),131-133.
- Mas-Coma, S. & Montoliu, I. (1986). The life cycle of *Brachylaima ruminiae* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae), a parasite of rodents. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 72, 739-753.
- Mas-Coma, S., Esteban, J.G., Fuentes, M.V., Bargues, M.D., Valero, M.A. & Galan-Puchades, M.T. (1998). Helminth parasites of small mammals (Insectivores and Rodents) on the

- Pityusic Island of Formentera (Balearic Archipelago). *Research and Reviews in Parasitology*, 58(2), 125-133.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A. & Bargues, M.D. (2008). Effects of Climate change on animal and zoonotic helminthiases. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 27(2), 443-457.
- Mathias, M.L. (1999). *Guia dos mamíferos terrestres de Portugal Continental, Açores e Madeira*. Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza (ICN).
- McInnes, E., Kohn, H., Carmichael, I., Rasmussen, L., Noonan, D. & Stevenson, R. (2014). Larvae of *Taenia taeniaformis* in the Liver of a Laboratory Rat (*Rattus norvegicus*). *Annals of Clinical Pathology*, 2(3), 1028.
- Meerburg, B.G., Singleton, G.R. & Kijlstra, A. (2009). Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(3), 221-270.
- Menezes, D.M., Freitas, I.C., Gouveia, L.M., Mateus, M., Domingues M.M., Oliveira, P. & Fontinha, S. (2006). *A Floresta Laurissilva da Madeira – Património Mundial*. (2ª edição), Rui Cunha Fotografia e Audiovisuais e Serviço do Parque Natural da Madeira, Região Autónoma da Madeira.
- Monroy, F.G. & Enriquez, F.J. (1992). *Heligmosomoides polygyrus*: A Model for Chronic Gastrointestinal Helminthiasis. *Parasitology Today*, 8(2), 49-54.
- Muehlenbachs, A., Bhatnagar, J., Agudelo, C.A., Hidron, A., Eberhard, M.L., Mathison, B.A., Frace, M.A., Ito, A., Metcalfe, M.G., Rollin, D.C., Visvesvara, G.S., Pham, C.D., Jones, T.L., Greer, P.W., Hoyos, A.V., Olson, P.D., Diazgranados, L.R. & Zaki, S.R. (2015). Malignant Transformation of *Hymenolepis nana* in a Human Host. *The New England Journal of Medicine*, 373(19), 1845-1852.
- Musser, G., Amori, G., Hutterer, R., Kryštufek, B., Yigit, N. & Mitsain, G. (2008). *The IUCN Red List of Threatened Species: Mus musculus*. Version 2015.2. Acedido em Jul. 22, 2015, disponível em <http://www.iucnredlist.org>
- Naupay-Igreda, A., Pinedo-Reyes, K.M. & Robles-Noriega, K. (2014). First record of *Brachylaima mazzantii* Travassos, 1927 in domestic pigeon (*Columba livia*) in Peru. *Neotropical Helminthology*, 8(2), 463-467.
- Newcomer, C.E. & Fox, J.G. (2007). Zoonoses and Other Human Health Hazards. In Fox, J.G., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomer, C.E., Quimby, F.W. & Smith, A.L. (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research. Volume 1: History, Wild Mice, and Genetics*. (2nd ed). (pp.719-745). Academic Press/Elsevier, USA.
- Nieberding, C.M. & Olivieri, I. (2006). Parasites proxies for host genealogy and ecology? *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 156-165.
- Nieberding, C., Morand, A., Libois, R. & Michaux, J.R. (2006). Parasites and the island syndrome: The colonization of the western Mediterranean islands by *Heligmosomoides polygyrus* (Dujardin, 1845). *Journal of Biogeography*, 33, 1212-1222.
- Novak, M., Koschinsky, M., Smith, T. & Evans, W.S. (1986). Growth and development of *Hymenolepis nana* in mice maintained at different environmental temperatures. *International Journal for Parasitology*, 16(1), 13-17.
- Oliveira, P., Menezes, D., Trout, R., Buckle, A., Geraldés, P. & Jesus, J. (2010). Successful eradication of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and house mouse (*Mus*

*musculus*) from the island of Selvagem Grande (Macaronesian archipelago), in the Eastern Atlantic. *Integrative Zoology*, 5(1), 70-83.

- Olsen, O.W. (1986). *Animal Parasites: Their Like Cycles and Ecology*. (3rd ed.). New York: Dover Publications, Inc.
- Olsen, L-H. (2013) *Tracks and Signs of the Animals and Birds of Britain and Europe*. Oxford: Princeton University Press.
- Ortuño, A. & Castellà, J. (2011). Intestinal Parasites in Shelter Dogs and Risk Factors Associated with the Facility and its Management. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 66(3), 103-107.
- Panesar, T.S. & Croll, N.A. (1980). The location of parasites within their hosts: site selection by *Trichuris muris* in the laboratory mouse. *International Journal for Parasitology*, 10, 261-273.
- Pereira, V.M.M. (2009). *Estudo da helmintofauna de Mus musculus (Rodentia) em São Miguel (Açores): factores indutores de diversidade e potencial zoonótico*. Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Lisboa: Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Petter, A.J. & Quentin, J-C. (1976). No. 4. Keys to Genera of the Oxyuroidea. In R.C. Anderson, A.G. Chabaud & S. Willmott (Eds.), *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. (pp. 29). Farnham Royal, Bucks, U.K.: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Poulin, R. (1996). Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being a male? *The American Naturalist*, 147(2), 287-295.
- Pritchett, K.R. (2007). Helminth Parasites of Laboratory Mice. In Fox, J.G., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomer, C.E., Quimby, F.W. & Smith, A.L. (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research. Volume 1: History, Wild Mice, and Genetics*. (2nd ed). (pp.719-745). Academic Press/Elsevier, USA.
- Ramsden, E. (2009). The urban animal: population density and social pathology in rodents and humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 87, 82-82. Acedido em Ago. 3, 2015, disponível em: <http://www.who.int/bulletin/volumes/87/2/09-062836/en/>
- Read, C.P. (1951). The "Crowding Effect" in Tapeworms Infections. *The Journal of Parasitology*, 37(2), 174-178.
- Redrobe, S.P. & Patterson-Kane, J.C. (2005). *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*) in Captive Rodents in a Zoological Garden. *Journal of Comparative Pathology*, 133, 73-76.
- Resendes, A.R., Amaral, A.F.S., Rodrigues, A. & Almeria, S. (2009). Prevalence of *Calodium hepaticum* (Syn. *Capillaria hepatica*) in house mice (*Mus musculus*) in the Azores archipelago. *Veterinary Parasitology*, 160, 340-343.
- Ribeiro, M.L. & Ramalho, M.M. (2007). *Uma visita geológica ao Arquipélago da Madeira – Principais locais geo-turísticos*. Direção Regional do Comércio, Indústria e Energia/Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação. Acedido em Ago. 1, 2015, disponível em: [http://drcie.gov-madeira.pt/drcie/index.php?option=com\\_content&view=article&id=381&Itemid=840](http://drcie.gov-madeira.pt/drcie/index.php?option=com_content&view=article&id=381&Itemid=840)

- Roberts, L.S. & Janovy, J.Jr. (2009). *Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology*. (8th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Robles, M.R., Navone, G.T. & Villafañe, I.E.G. (2008). New morphological details and first records of *Heterakis spumosa* and *Syphacia muris* from Argentina. *Comparative Parasitology*, 75(1), 145-149.
- Robles, M.R. & Navone, G. (2014). New host records and geographic distribution of species of *Trichuris* (Nematoda: Trichuriidae) in rodents from Argentina with an updated summary of records from America. *Mastozoología Neotropical*, 21(1), 67-78.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Panti-May, J.A., Parada-López, J., Hernández-Betancourt, S.F. & Ruiz-Pinã, H.A. (2011). The occurrence of the larval cestode *Cysticercus fasciolaris* in rodent populations from the Cuxtal ecological reserve, Yucatan, Mexico. *Journal of Helminthology*, 85, 458-461.
- Rose, R.K. & Bellows, A.S. (2014). Population Responses to Stomach Worms (Order Spirurida) in Hispid Cotton Rats in Southeastern Virginia [abstract]. *Proceedings of the American Society of Mammalogists 94<sup>th</sup> Annual Meeting*, p.62, Oklahoma: Oklahoma City.
- Samuel, W.M., Pybus, M.J. & Kocan, A.A. (Eds.) (2001). *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. (2nd ed.). USA: Iowa State University Press/Ames.
- Sans, M.A. (2002). *Mus domesticus* Ruty, 1772. In Palomo, L.J. & Gibert, J. (Eds.), *Atlas de los Mamíferos Terrestres de España*. (pp. 420-423). Madrid, Dirección General de Conservación de la Naturaleza – SECEM-SECEMU.
- Scott, M.E. (1987). Regulation of mouse colony abundance by *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasitology*, 95, 111-124.
- Sergeant, E. (2015). *Epitools epidemiological calculators*. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Acedido em Nov. 21, 2015, disponível em: <http://epitools.ausvet.com.au>
- Serviço do Parque Natural da Madeira (2011). *Parque Natural da Madeira*. Acedido em Ago. 1, 2015, disponível em: [http://www.pnm.pt/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2&Itemid=17&lang=pt](http://www.pnm.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=2&Itemid=17&lang=pt)
- Serviço do Parque Natural da Madeira (2014). *Áreas Classificadas na RAM*. Acedido em Ago. 2, 2015, disponível em: [http://www.pnm.pt/index.php?option=com\\_content&view=article&id=52&Itemid=57&lang=pt](http://www.pnm.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=52&Itemid=57&lang=pt)
- Serviço do Parque Natural da Madeira (2015). *Laurissilva da Madeira – Património Mundial*. Acedido em Ago. 1, 2015, disponível em: [http://www.pnm.pt/index.php?option=com\\_content&view=article&id=91&Itemid=79&lang=pt](http://www.pnm.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=91&Itemid=79&lang=pt)
- Silvar, C. (2014). *Illustrations for the Galicia Mammals Guide: Rodentia & Lagomorpha*. Acedido em Jul. 25, 2015, disponível em: <https://www.behance.net/gallery/14187521/RODENTIA-LAGOMORPHA>
- Singleton, G.R., Chambers, L.K. & Spratt, D.M. (1995). An experimental field study to examine whether *Capillaria hepatica* (Nematoda) can limit house mouse populations in Eastern Australia. *Wildlife Research*, 22(1), 31-53.

- Singleton, G.R. & Chambers, L.K. (1996). A manipulative field experiment to examine the effect of *Capillaria hepatica* (Nematoda) on wild mouse populations in Southern Australia. *International Journal for Parasitology*, 26(4), 383-398.
- Singleton, G.R. & Krebs, C.J. (2007). The Secret World of Wild Mice. In Fox, J.G., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomer, C.E., Quimby, F.W. & Smith, A.L. (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research. Volume 1: History, Wild Mice, and Genetics*. (2nd ed). (pp.25-51). Academic Press/Elsevier, USA.
- Skrjabin, K.I. (1964). *Keys to the Trematodes of Animals and Man*. Illinois, USA: University of Illinois Press, Urbana.
- Soulsby, E.J.L. (1968). *Helminths, Arthropods & Protozoa of Domestic Animals*. (6<sup>th</sup> ed). London: Baillière, Tindall and Cassell.
- Spratt, D.M. & Singleton, G.R. (1987). Experimental embryonation and survival of eggs of *Capillaria hepatica* (Nematoda) under mouse burrow conditions in cereal-growing soils. *Australian Journal of Zoology*, 35(4), 337-341.
- Spratt, D.M. & Singleton, G.R. (2001). Hepatic capillariasis. In Samuel, W.M., Pybus, M.J. & Kocan, A.A. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. (2nd ed.). USA: Iowa State University Press/Ames.
- Taffs, L.F. (1976). Pinworm infections in laboratory rodents: a review. *Laboratory Animals*, 10, 1-13.
- Tena, D., Simón, M.P., Gimeno, C., Pomata, M.T.P., Illescas, S., Amondarain, I., González, A., Domínguez, J. & Bisquert, J. (1998). Human Infection with *Hymenolepis diminuta*: Case Report from Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(8), 2375-2376.
- Tenora, F., Beránek, L. & Staněk, M. (1988). Larvocysts of the cestode *T. polyacantha* (Leuckart, 1856) parasitizing *Oryctolagus cuniculus*. *Folia Parasitologica*, 35, 21-22.
- Thienpont, D., Rochette, F. & Vanparijs, O.F.J. (1979). Diagnosing Helminthiasis through Coprological Examination. Janssen Research Foundation.
- Thomas, F., Verneau, O., Meeûs, T. & Renaud, F. (1996). Parasites as to host evolutionary prints: insights into host evolution from parasitological data. *International Journal for Parasitology*, 26(7), 677-686.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. (1996). *Veterinary Parasitology*. (2<sup>nd</sup> ed). University of Glasgow, Scotland: Blackwell Publishing.
- Wanless, R.M., Angel, A., Cuthbert, R.J., Hilton, G.M., & Ryan, P.G. (2007) Can predation by invasive mice drive seabird extinctions? *Biology Letters*, 3, 241-244.
- Wardle, R.A. & McLeod, J.A. (1968). *The Zoology of Tapeworms*. New York: Hafner Publishing Company.
- Weaver, E.R. (1920). *Studies on the morphology of the nematode: Heterakis spumosa Schneider*. M.Sc. Thesis. Illinois: The Graduate School of the University of Illinois.
- Wilde, H., Suankratay, C., Thongkam, C. & Chaiyabutr, N. (2001). Human Gongylonema infection in Southeast Asia. *Journal of Travel Medicine*, 8, 204-206.

- Wilson, M.E., Lorente, C.A., Allen, J.E. & Eberhard, M.L. (2001). *Gongylonema* Infection of the Mouth in a Resident of Cambridge, Massachusetts. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1378-1380.
- Zajac, A.M. & Conboy, G.A. (Eds.) (2012). *Veterinary Clinical Parasitology*. (8<sup>th</sup> ed.). Wiley-Blackwell.
- Zenner, L. (1998). Effective eradication of pinworms (*Syphacia muris*, *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*) from a rodent breeding colony by oral anthelmintic therapy. *Laboratory Animals*, 32(3), 337-342.
- Zimmerman, D.W. (1987). Comparative power of Student T test and Mann-Whitney U test for unequal sample sizes and variances. *The Journal of Experimental Education*, 55(3), 171-174.

## Anexos

Anexo A – Resumo da comunicação apresentada sob a forma de painel no 14<sup>th</sup> *Rodens et Spatium* International Conference on Rodent Biology, 28 July-2 August 2014, Lisbon, Portugal.

### **Helminthic infections in the liver of *Mus musculus domesticus* from Madeira Archipelago - Preliminary Results**

Valente A.<sup>1</sup>, Gabriel S.I.<sup>2</sup>, Gomes L.<sup>1</sup>, Correia J.<sup>1</sup>, Mathias M.L.<sup>2</sup>, Madeira de Carvalho L.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal. <sup>2</sup>CESAM - Lisboa, Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal. Email: madeiradecarvalho@fmv.ulisboa.pt

Rodents play a major role as intermediate and reservoir hosts for a substantial number of parasites. Among them, many helminth species are zoonotic, which may represent a serious Public Health problem. The house mouse, *Mus musculus*, is one of the most widespread rodents worldwide and due to its commensal lifestyle, is an important disseminator of parasites. The house mouse populations from Madeira archipelago have been extensively studied over the years, mostly due to the unusual chromosomal diversity they exhibit on the main island. However, nothing was known about the parasitofauna of these populations. Hence, livers from a total of 24 mice from Madeira and Porto Santo were screened for macroparasites and macroscopic lesions. Twenty out of 24 livers (83.3%) were positive for parasites. Mice from Madeira were positive for 92.3% of the samples (12/13) and in Porto Santo for 72.7% (8/11). *Calodium hepaticum* was found in 7 mice (29.1%), *Cysticercus fasciolaris* in 8 (33,3%) and *Cysticercus* spp. in 7 (29,1%). All three parasites were found in Madeira, while in Porto Santo only *Cysticercus* spp. was detected. There was not a clear association between severity of lesions and parasitic burden, except for *C. hepaticum*, with egg counts/mL ranging 2780-11060 (mean=6280 eggs/mL). *C. hepaticum* infection showed intermediate prevalence in Madeira (29.1%) when compared with the Azores (19.6-40.2%) and the Canary Islands (1.9%). Infection by larval stages of *Cysticercus* spp. was more prevalent in Madeira (29.1%) than in the Azores (7.6%) and Canary Islands (5.8%). This variation across the different island systems may be due to differences in mouse population densities, colonization origin and/or level of interaction with definitive hosts.

# Helminthic infections in the liver of *Mus musculus* from Madeira Archipelago – Preliminary Results

Valente A.<sup>1</sup>, Gabriel S.I.<sup>2</sup>, Gomes L.<sup>1</sup>, Correia J.<sup>1</sup>, Mathias M.L.<sup>2</sup>, Madeira de Carvalho L.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, ULisboa; Avenida da Universidade Técnica 1300-477, Lisboa, Portugal.

E-mail: madeiradecarvalho@fmv.ulisboa.pt

<sup>2</sup>CESAM, Faculty of Sciences, Animal Biology Department, ULisboa, Portugal.



## Introduction

Rodents have a major role as intermediate and reservoir hosts for a high number of parasites, namely helminths. Many of these species are zoonotic, being a serious problem at Public Health level. *Mus musculus*, due to its lifestyle and concentration, allows dissemination of parasites and their life cycles in urban and periurban ecosystems, even in isolated ecosystems like islands.<sup>1,2,4</sup>

## Objective

A research project has been carried out in Madeira Archipelago to assess the major populations/subpopulations of *M. musculus* and the present communication reports the first results on the liver parasitofauna of these rodents, highlighting their importance in Public Health and as biological tags.

## Material and Methods

Livers from 42 animals were preserved in ethanol 98% and screened for macroparasites and macroscopic lesions, being built a classification according to their severity and distribution in 3 points scale. Parasitological exams with stereoscopic microscope involved liver scraping, on surface and parenchyma lesions, searching *Calodium hepaticum* stages (adults and eggs) and *Cysticercus* spp. larval stages. Samples removed from the liver and gall bladder were observed in fresh preparations with tap water for egg count and larval stages identification. Eighteen livers were examined by histopathology techniques and stained with H&E standard technique.

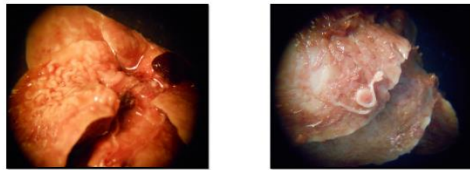


Fig. 1 (left) – Macroscopic *Calodium hepaticum* lesions on the surface of a liver (6.7X, original). Fig. 2 (right) – Adult *Calodium hepaticum* on the surface of a liver (6.7X, original).

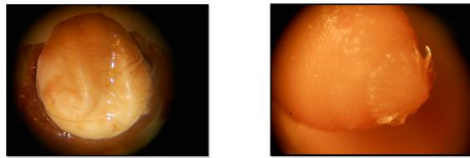


Fig. 3 (left) – Vesicle of *Cysticercus fasciolaris* on the surface of a liver (6.7X, original). Fig. 4 (right) – Protoscolex of a *Cysticercus fasciolaris* (6.7X, original).

Fig. 5 – Fresh smear with *Calodium hepaticum* eggs recovered from a liver sample. (100X, original).

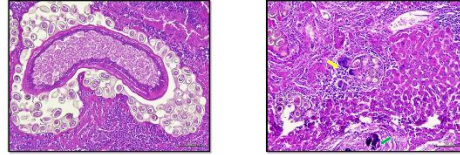
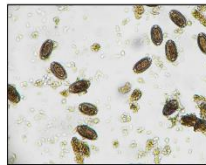


Fig. 6 (left) – Liver exhibiting an adult female of *Calodium hepaticum* carrying numerous eggs, surrounded by inflammatory tissue. Identification of inflammatory reaction with mononucleated cells infiltrate, (original). Fig. 7 (right) – Liver with several clusters of *Calodium hepaticum* eggs surrounded by inflammatory reaction, with mononucleated cells infiltrate, multinucleated giant cell (yellow arrow). Some eggs present dystrophic calcification (green arrow), (original).

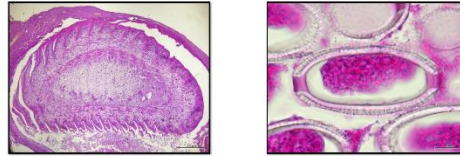
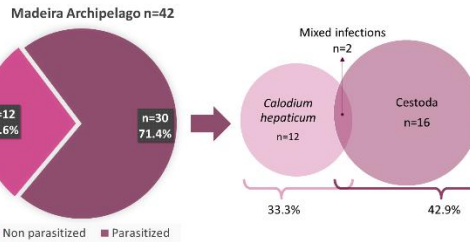


Fig. 8 (left) – Liver presenting a vesicle containing an exterior capsule with a *Cysticercus* spp. larval stage in its interior, (original). Fig. 9 (right) – Histological section of a *Calodium hepaticum* egg presenting a lemon shape, two plugs and a thick shell exhibiting an external striated appearance, (original).



## Results and Discussion

30 out of 42 livers (71.4%) were positive for parasites. House mice from Madeira island were positive for 70.9% of the samples (22 in 31) and in Porto Santo was found a prevalence of 72.7% (8 in 11). *Calodium hepaticum* was found in 14 mice (33.3%), *Cysticercus fasciolaris* in 13 (30.9%) and *Cysticercus* spp. in 7 (16.7%). All parasites were found in Madeira, while in Porto Santo were only found *Cysticercus* spp. There was not a clear association between severity of lesions and parasitic burden, except for *C. hepaticum*, always associated with high score lesions (3 points), with egg counts/ml ranging 5360-30040, with a mean number of 12643 eggs/ml. Only two animals showed mixed infections (4.8%). *C. hepaticum* infection showed intermediate prevalence in Madeira (33.3%) compared with Azores (19.6-40.2%)<sup>4,5</sup>, but much higher compared with Canary islands (1.9%)<sup>3</sup>. Infection by *Cysticercus fasciolaris* larval stages, were more prevalent in Madeira (30.9%) than in Azores (7.6%)<sup>4</sup> and Canary islands (5.8%)<sup>3</sup>. These differences may be due to distinct rodent densities and/or different colonisation origins of house mouse populations or even different levels of interaction with definitive hosts.

## Conclusion

The population of *M. musculus* from Madeira Archipelago showed a high level of liver parasitic infection (71.4%), mostly from Madeira island. *C. hepaticum*, *C. fasciolaris* and *Cysticercus* spp. were the only helminths found, being the first one a threat as a potential zoonotic agent.

## References

- António Crespo. (2012). Controlo de Pragas no Jardim Zoológico de Lisboa - Particular relevância para o controlo de roedores e sua infestação parasitária. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Correia J., et al. (2011). Four cases of *Calodium hepaticum* infection in non-human primates from the Lisbon Zoological garden, Portugal. Proc. Int. Conference on diseases of Zoo and Wild Animals, 13-22.
- Feliu et al. (2012). Parasite fauna of rodents (Murinae) from El Hierro (Canary islands, Spain): a multidisciplinary approach. In Acta Parasitologica, 2012, 57(2), 171-178.
- Pereira, V.M.M. (2009). Estudo da helmintofauna de *Mus musculus* (Rodentia) em São Miguel (Açores): fatores indutores de diversidade e potencial zoonótico. Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Lisboa: Faculdade de Ciências – Universidade de Lisboa.
- Resendes et al. (2009). Prevalence of *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*) in house mice (*Mus musculus*) in the Azores archipelago. Veterinary Parasitology 160 (2009) 340-343.

Funding: CIISA-FMV-ULisboa and CESAM - Animal Biology Department of FCUL Project PEst-DE/AGR/UI0276/2014 and PTDC/BIA-EVF/116884/2010 (funded by FCT).

Anexo B – Resumo da comunicação apresentada sob a forma de painel no 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 16-20 August, Liverpool, UK.

### **Gastrointestinal and liver helminthic infections in house mice (*Mus musculus domesticus*) from the Madeira Archipelago: implications on Animal and Public Health**

Valente A.<sup>1</sup>, Gabriel S.I.<sup>2</sup>, Gomes L.<sup>1</sup>, Correia J.<sup>1</sup>, Mathias M.L.<sup>2</sup>, Madeira de Carvalho L.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal. <sup>2</sup>CESAM - Lisboa, Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal. Email: madeiradecarvalho@fmv.ulisboa.pt

Rodents are major reservoirs for parasites with important implications for human and animal health. The house mouse, due to its commensal habits and proximity with human dwellings is one of the most problematic species concerning the spread of zoonotic parasites. In Madeira and Porto Santo islands, this risk is potentiated by high population densities and a close relationship with humans and agricultural products. In this study, we assessed the parasitofauna of these insular populations for the first time. Livers of 120 mice, 100 mice from Madeira and 20 from Porto Santo, were screened for lesions and parasites, being 67 (55.8%) positive. In Madeira, mice were positive for 56% of the samples and in Porto Santo for 55%. *Calodium hepaticum* was found in 28 mice (23.3%), *Cysticercus fasciolaris* in 25 (20.8%) and *Cysticercus* sp. in 19 (15.8%). These last two species were found on both islands while *C. hepaticum*, a zoonotic species, was only detected in Madeira and spread throughout the island. When compared with results from previous studies on other archipelagos, namely Azores and Canary islands, *C. hepaticum* infection showed an intermediate prevalence in Madeira (28%). *C. fasciolaris* was more prevalent in Madeira (23%) than in the Azores and Canary Islands. The digestive systems of the 120 mice were also dissected and screened, 109 (90.8%) of which were positive for parasites. 90% were positive for at least one parasite species for both Madeira (n=100) and Porto Santo (n=20). Much like for the hepatic parasites, differences were observed between parasite species composition of the two studied islands. *Mastophorus muris* (10%), Trichostrongylidae (4%), *Syphacia obvelata* (75%), *Trichuris muris* (50%) and *Heterakis spumosa* (5%) were found in Madeira, whilst in Porto Santo only *Syphacia obvelata* (90%) was detected. This variation across islands may be due to differences in mouse population densities, genetic pool, colonization origin and/or different levels of interaction with definitive hosts. *C. hepaticum* and *C. fasciolaris* are zoonotic agents whose life cycles involve domestic carnivores in the proximity with humans. *S. obvelata* also has a zoonotic potential due to its life cycle and was detected throughout both islands. The human infections by these parasites are usually underestimated, possibly becoming a serious concern in terms of Public Health.

# Gastrointestinal and liver helminthic infections in house mice (*Mus musculus domesticus*) from the Madeira Archipelago: Implications on Animal and Public Health



Valente A.<sup>1</sup>, Gabriel S.I.<sup>2</sup>, Gomes L.<sup>1</sup>, Correia J.<sup>1</sup>, Mathias M.L.<sup>2</sup>, Madeira de Carvalho L.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, ULisboa; Avenida da Universidade Técnica 1300-477, Lisboa, Portugal. E-mail: madeiradecarvalho@fmv.ulisboa.pt

<sup>2</sup>CESAM, Faculty of Sciences, Animal Biology Department, ULisboa, Portugal.

## Introduction

Rodents are major reservoirs for parasites with important implications for human and animal health. The house mouse, due to its commensal habits and proximity with human dwellings is one of the most problematic species concerning the spread of zoonotic parasites.<sup>1,2,4</sup>



Fig. 1 – Total of samples from each island of the Madeira Archipelago.

## Objective

In Madeira and Porto Santo islands, this risk is potentiated by high population densities and a close relationship with humans and agricultural products. In this study, we assessed the parasitofauna of these insular populations of the house mouse for the first time.



Fig. 2 – Total parasite prevalence in both liver and digestive system of *Mus musculus domesticus* in Madeira Island (M), Porto Santo Island (PS) and Madeira Archipelago (A).

## Results and Discussion

Livers of 120 mice, 100 mice from Madeira and 20 from Porto Santo, were screened for lesions and parasites, being 67 (55.8%) positive. In Madeira, mice were positive for 56% of the samples and in Porto Santo for 55%. *Calodium hepaticum* was found in 28 mice (23.3%), *Cysticercus fasciolaris* in 25 (20.8%) and *Cysticercus* sp. in 19 (15.8%). These two last species were found on both islands while *C. hepaticum*, a zoonotic species, was only detected in Madeira and spread throughout the island. When compared with results from previous studies on other archipelagos, namely Azores<sup>4,5</sup> and Canary islands<sup>3</sup>, *C. hepaticum* infection showed an intermediate prevalence in Madeira (28%). *C. fasciolaris* was more prevalent in Madeira (23%) than in Porto Santo (10%), Azores<sup>4</sup> and Canary

islands<sup>3</sup>. *Cysticercus* sp. was more prevalent in Porto Santo (45%) than in Madeira (10%). The digestive systems of the 120 mice were also dissected and screened, 109 (90.8%) of which were positive for parasites. 90% were positive for at least one parasite species for both Madeira (n=100) and Porto Santo (n=20). Much like for the hepatic parasites, differences were observed between species composition of the two studied islands. *Mastophorus muris* (10%), *Heligmosomoides polygyrus* (4%), *Syphacia obvelata* (75%), *Trichuris muris* (50%) and *Heterakis spumosa* (5%) were found in Madeira, whilst in Porto Santo only *Syphacia obvelata* (90%) was detected.

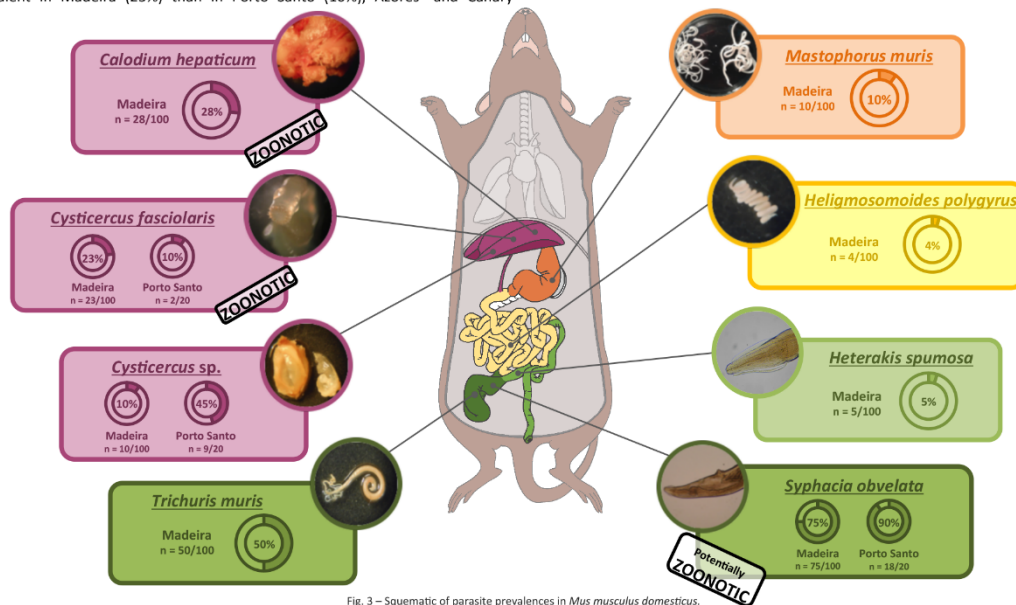


Fig. 3 – Schematic of parasite prevalences in *Mus musculus domesticus*.

## Conclusion

This variation across islands may be due to differences in mouse population densities, genetic pool, colonization origin and/or different levels of interaction with definitive hosts. *C. hepaticum* and *C. fasciolaris* are zoonotic agents whose life cycles involve domestic carnivores in the proximity with humans. *S. obvelata*

also has a zoonotic potential due to its life cycle and was detected throughout both islands. The human infections by these parasites are usually underestimated or unknown, possibly due to the lack of parasitological/epidemiological data, although they may be a serious concern in terms of Public Health.

## References

- <sup>1</sup>António Crespo. (2012) Controlo de pragas no Jardim Zoológico de Lisboa - Particular relevância para o controlo de roedores e sua infecção parasitária. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- <sup>2</sup>Correia, J., et al. (2011). Four cases of *Calodium hepaticum* infection in non-human primates from the Lisbon Zoological garden, Portugal. Proc. Int. Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals, 13-22.
- <sup>3</sup>Feixas et al. (2012). Parasite fauna of rodents (*Murinae*) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach. In *Acta Parasitologica*, 2012, 57(1), 171-178.
- <sup>4</sup>Pereira, M.M.M. (2008). Estudo da helmintofauna de *Mus musculus* (Rodentia) em São Miguel (Açores): fatores indicadores de diversidade e potencial zoonótico. Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Lisboa: Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa.
- <sup>5</sup>Resendes et al. (2009). Prevalence of *Calodium hepaticum* (Syn. *Capillaria hepatica*) in house mice (*Mus musculus*) in the Azores archipelago. *Veterinary Parasitology* 160 (2009) 340-343.

Funding: CISA-FMV-ULisboa Project UIDB/00276/2013 and CESAM - Animal Biology Department of FCUL Project PTDC/BIA-EVF/116884/2010 (funded by FCT).

### **Preparação de Lactofenol d'Amann**

#### **Ingredientes:**

- 100 g de fenol (cristais puros);
- 100 mL de ácido láctico;
- 200 mL de glicerina (sinonímia de glicerol, densidade de 1,261 g/cm<sup>3</sup>), o que corresponde a 158,6 g aproximadamente;
- 100 mL de água.

#### **Preparação:**

1. Adicionar o fenol à água e aquecer até este se dissolver;
2. Adicionar o ácido láctico e a glicerina. Misturar até homogeneizar;
3. Guardar num frasco de vidro castanho e abrigado da luz.

#### **Nota: Outras proporções**

- 20 g de fenol (cristais puros);
- 20 g de ácido láctico (densidade de 1,21 g/cm<sup>3</sup>), o que corresponde a 16,53 mL aproximadamente;
- 40 g de glicerina;
- 20 mL de água.

### **Coloração de Tremátodes e Céstodes pelo Carmim Álcool Clorídrico**

#### **Colheita e Fixação:**

Após colheita, por remoção cuidadosa do helminte do órgão parasitado, colocá-lo em água da torneira ou soro fisiológico. Deixar no frigorífico a 4°C durante cerca de 24 horas para que se dê a morte em extensão.

Colocar os parasitas entre duas lâminas e comprimi-los por meio de cordel, elásticos ou molas. Deixar as lâminas em álcool-formol a 5% (950 mL de álcool + 50 mL de formol) durante cerca de 24 a 48 horas.

Para conservar os parasitas indefinidamente colocá-los em álcool a 70°.

#### **Coloração:**

4. Colocação em água destilada com 3 gotas de ácido acético glacial durante 5 minutos;
5. Lavagem em água destilada (2 placas);
6. Colocação no carmim álcool clorídrico durante 10 (céstodes e tremátodes pequenos) a 15 minutos (*Fasciola hepatica*);
7. Álcool a 70° – fixação (banho rápido);
8. Álcool a 70° – 2ª vez para sair excesso de corante;
9. Diferenciação em álcool clorídrico a 1-5% (álcool a 80° com 8 gotas de ácido clorídrico), até que o parasita deixe de largar corante e os órgãos apresentem diferentes tonalidades – controlar à lupa;
10. Lavagem em água da torneira até adquirir cor de malva (2 placas);
11. Desidratação por passagem em álcoois de concentração crescente (70°, 95°, 100° e 100°), durante 10 minutos em cada um;
12. Esclarecimento em salicilato de metilo, xilol ou tolueno, até que o parasita vá ao fundo;
13. Montagem em bálsamo do Canadá, Depex ou Entellan.

#### **Mayer's Acid Carmine:**

- H<sub>2</sub>O destilada – 15 mL
- HCl conc. – 15 gotas
- Carmim (“alum lake”) – 4g
- Etanol 85% – 95 mL

Anexo E – Técnicas Coprológicas. Técnica Flutuação pelo método de Willis, Sedimentação Natural e Esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen.

## **Técnicas Coprológicas**

### **Flutuação pelo método de Willis – (qualitativo)**

- Homogeneizar uma certa quantidade de fezes com uma certa quantidade de solução saturada de Sacarose ou de NaCl, aproximadamente 3 ou 4 gramas de fezes para 15 a 20 mL de solução saturada – não há necessidade de pesar ou medir, é um teste qualitativo.
- Filtrar com um passador e um funil para um tubo de ensaio e criar no topo um pequeno menisco convexo no qual se aplica de imediato uma lamela após remoção rápida dos detritos de maior dimensão.
- Esperar cerca de 15 minutos para que os ovos flutuem, aderindo à lamela, retirar a lamela e colocá-la em cima de uma lâmina de vidro.
- Observar ao microscópio na objetiva de 4x, 10x e 40x.

### **Sedimentação natural – (qualitativo)**

- Homogeneizar uma certa quantidade de fezes com uma certa quantidade de água, aproximadamente 3 ou 4 gramas de fezes para 15 a 20 mL de água – não há necessidade de pesar ou medir, é um teste qualitativo.
- Filtrar com um passador e um funil para um tubo de ensaio, esperar que sedimente e homogeneizar com uma pipeta de Pasteur.
- Colocar uma amostra entre lâmina e lamela.
- Observar ao microscópio na objetiva de 4x, 10x e 40x.

### **Coloração de Ziehl-Neelsen**

- Realizar o esfregaço fecal numa lâmina de vidro, deixar secar muito bem.
- Cobrir o esfregaço com metanol – 1 minuto. (Não lavar).
- Cobrir com Fucsina – 10 minutos. (Lavar com água corrente).
- Lavar a lâmina com Álcool Clorídrico 1%. (Lavar com água corrente).
- Cobrir com Verde Malaquite 0,4% - 30 segundos. (Lavar com água corrente).
- Colocar lâmina ao alto para secar, ou secar com papel absorvente sem raspar o esfregaço.
- Observação com óleo de imersão na objetiva de 100x.

Anexo F – Caracterização taxonómica das espécies de helmintes (tremátodes, céstodes e nemátodes).

## Filo Platyhelminthes

### Classe Trematoda

Subclasse Digenea  
Família Brachylaimidae  
Género *Brachylaima* Dujardin, 1843  
*Brachylaima cribbi* n. sp. Butcher & Grove, 2001

### Classe Cestoda

Ordem Cyclophyllidea  
Família Taeniidae  
Subfam. Taeniinae  
Género *Taenia* Linnaeus, 1758  
*Cysticercus fasciolaris* forma larvar de *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786)  
Wolffügel, 1911  
Família Hymenolepididae  
Género *Hymenolepis* Weinland, 1858  
*Hymenolepis diminuta* Rudolphi, 1819  
Género *Rodentolepis* Spasskii, 1954  
*Rodentolepis nana* von Siebold, 1852

## Filo Nematoda

### Classe Adenophorea

#### Subclasse Enoplida

Ordem Trichocephalida  
Superfam. Trichinelloidea  
Família Capillariidae  
Género *Calodium* Dujardin, 1845  
*Calodium hepaticum* Moravec, 1982 (= *Capillaria hepatica* Bancroft, 1893)  
Família Trichuridae  
Género *Trichuris* Roederer, 1761  
*Trichuris muris* Schrank, 1788

## Classe Secernentea

### Ordem Ascaridida

Superfam. Heterakoidea

Família Heterakidae

Género *Heterakis* Dujardin, 1845

*Heterakis spumosa* Schneider, 1866

### Ordem Oxyurida

Superfam. Oxyuroidea

Família Oxyuridae

Género *Syphacia* Seurat, 1916

*Syphacia obvelata* Rudolphi, 1802

### Ordem Strongylida

Superfam. Trichostrongyloidea

Família Heligmosomidae

Género *Heligmosomoides* Hall, 1916

*Heligmosomoides polygyrus* Dujardin, 1845

### Ordem Spirurida

Superfam. Spiruroidea

Família Gongylonematidae

Género *Gongylonema* Molin, 1857

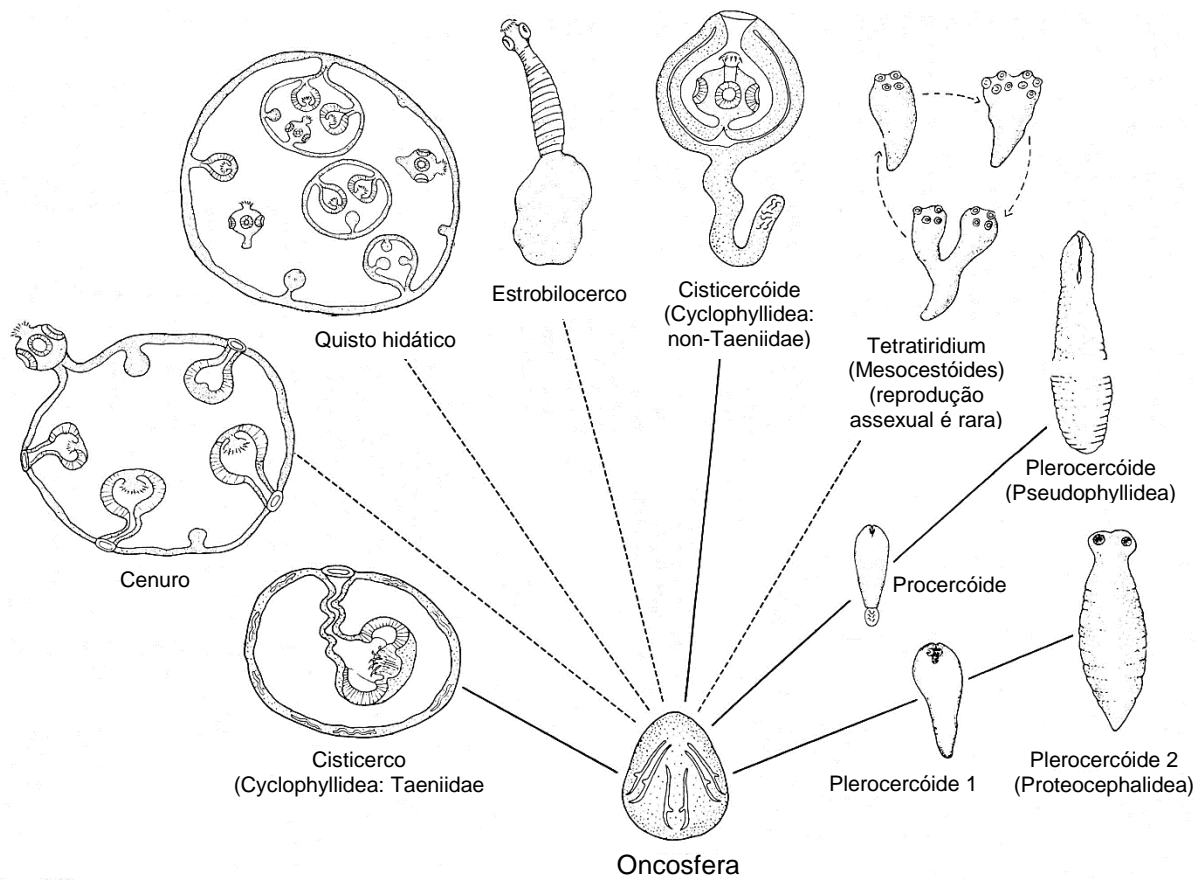
*Gongylonema neoplasticum* Fibiger et Ditlevsen, 1914

Família Spirocercidae

Género *Mastophorus* Diesing, 1853

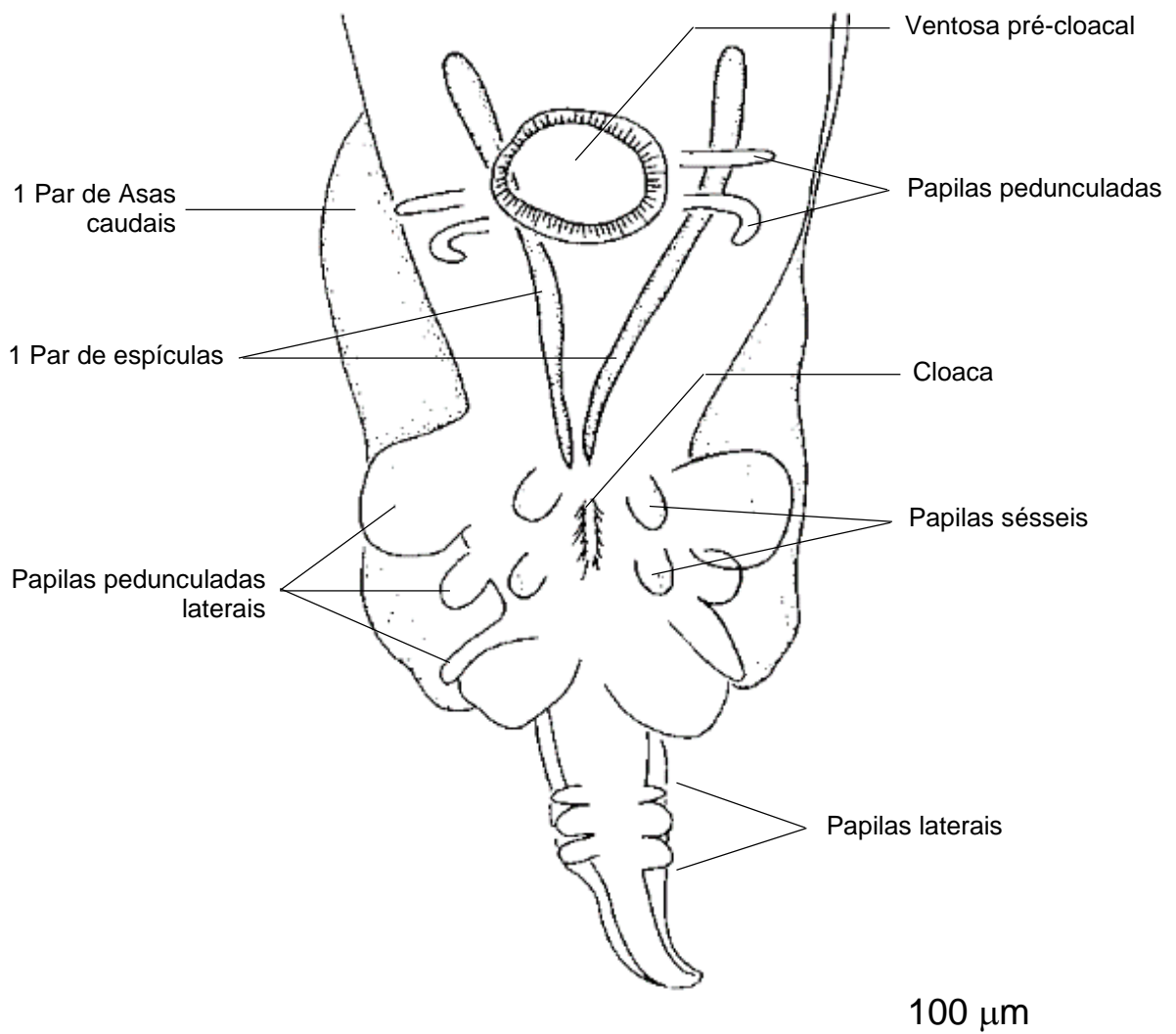
*Mastophorus muris* Gmelin, 1790

Anexo G – Esquema dos diferentes tipos de metacéstodes infetantes de céstodes. Adaptado de Dailey (1996).



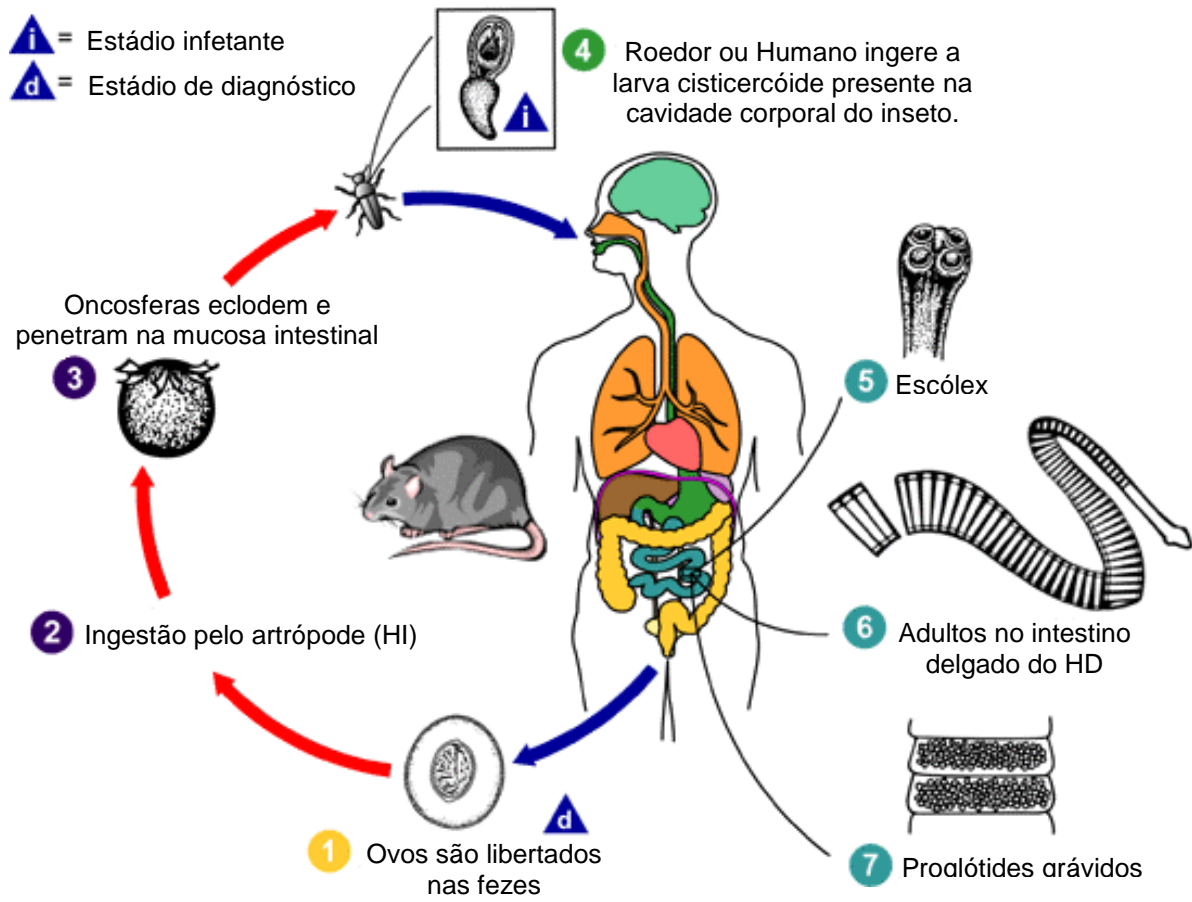
As linhas completas correspondem aos tipos de metacéstode base, a oncosfera corresponde a uma larva e não a um metacéstode.

Anexo H – Esquema da extremidade posterior de um macho de *Heterakis spumosa*.

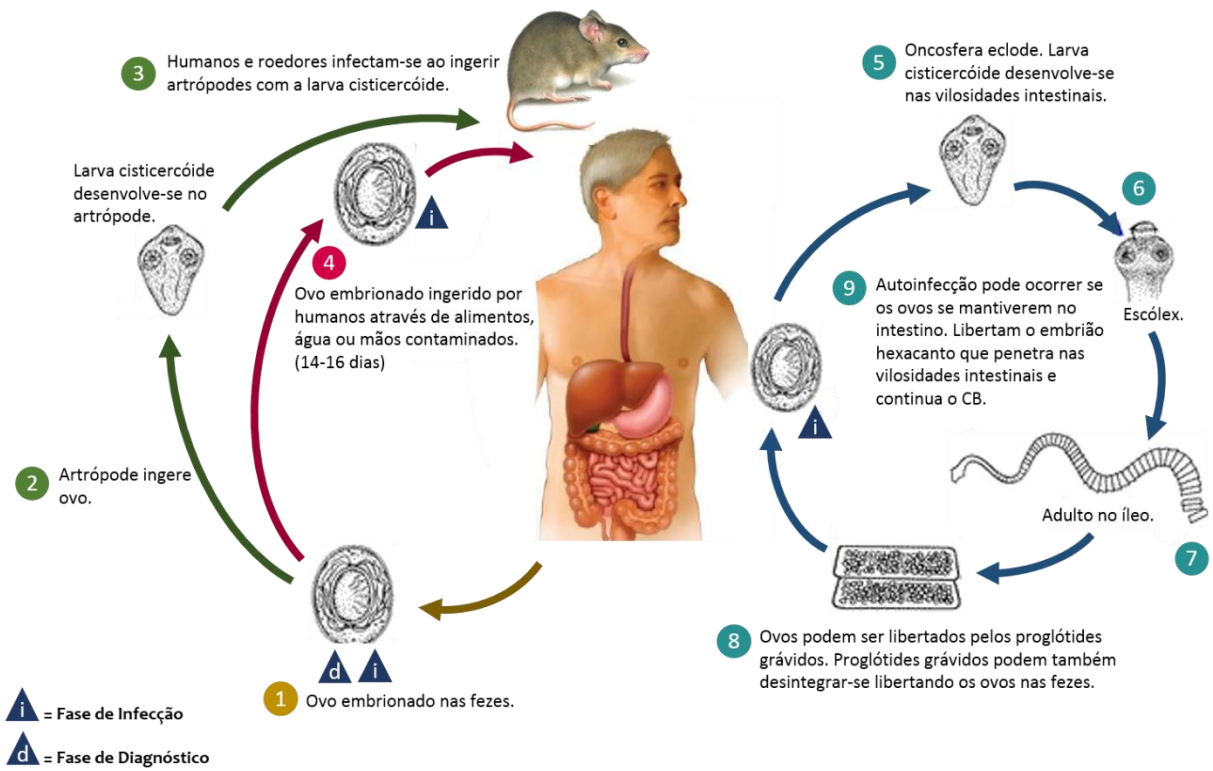


Ventosa genital pré-cloacal na porção caudal, contendo 10 papilas caudais (2 pares de papilas pedunculadas ao nível da ventosa, 3 pares de papilas pedunculadas laterais que suportam as asas caudais, 2 pares de papilas sésseis próximas da cloaca e 3 pares de papilas laterais na ponta da cauda) e 2 espículas em ligeira curvatura. Adaptado de Weaver (1920) e Robles *et al.* (2008).

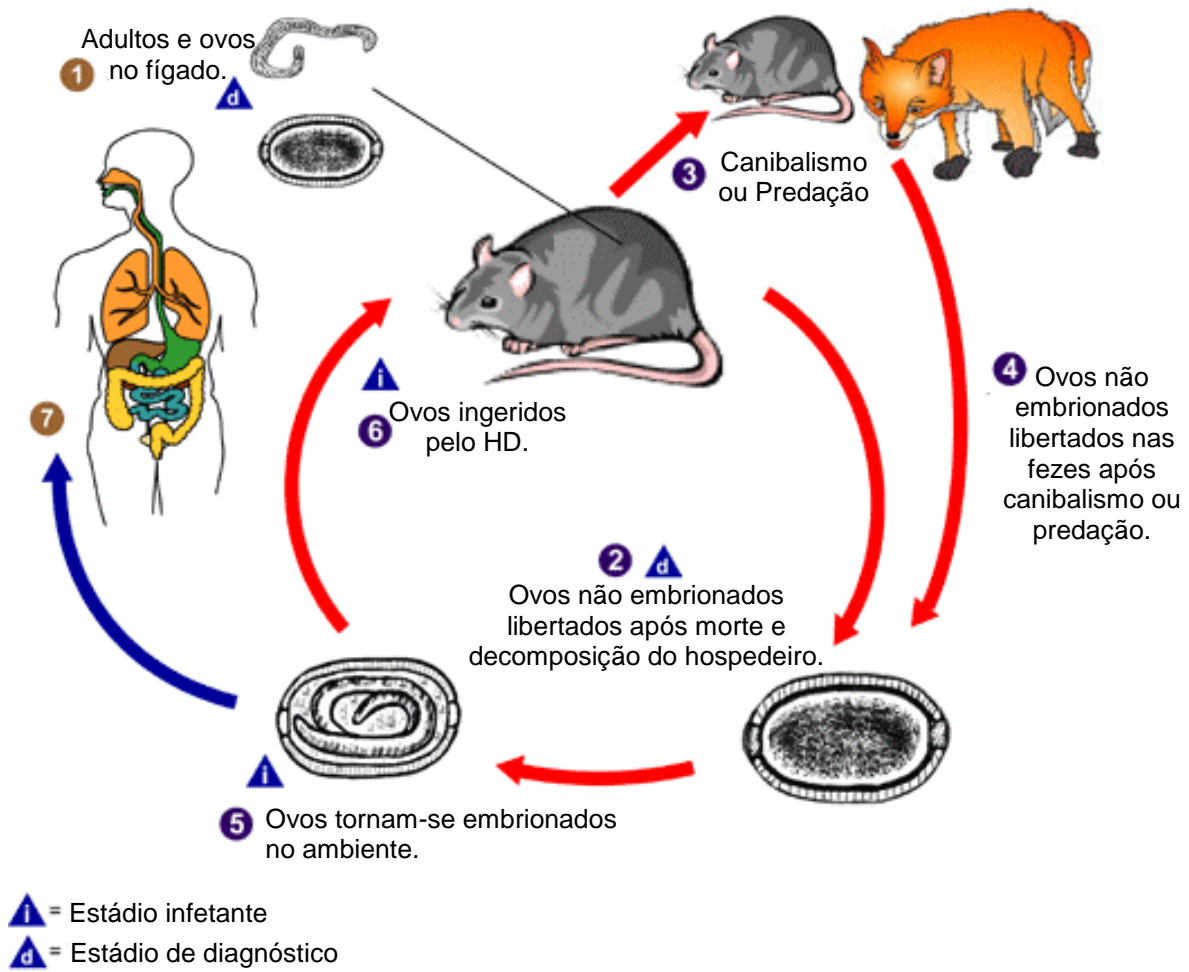
Anexo I – Ciclo biológico de *Hymenolepis diminuta*. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2013a).



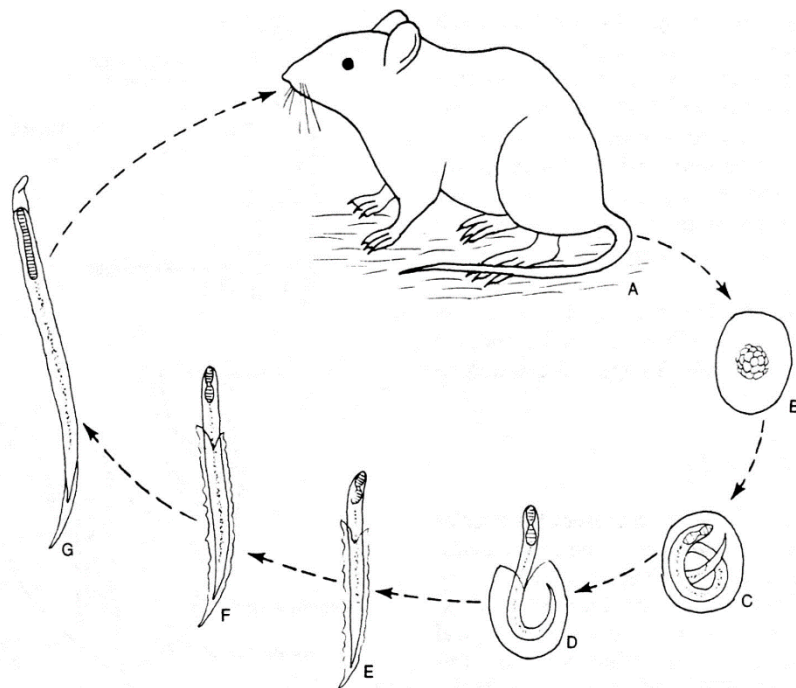
Anexo J – Ciclo biológico de *Rodentolepis nana*. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2013a).



Anexo K – Ciclo biológico de *Calodium hepaticum*. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2013b).



Anexo L – Ciclo biológico de *Heligmosomoides polygyrus*. Adaptado de Dailey (1996).



A - Parasitas adultos situam-se no intestino delgado do hospedeiro ratinho; B - ovos não embrionados são libertados nas fezes; C - ovos tornam-se embrionados no ambiente, contendo a larva L1 rabditiforme; D - eclosão da larva L1; E - larva L1 sofre muda para larva L2 rabditiforme; F - muda da larva L2; G - larva L3 infeta ratinho após ingestão.