



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Parasitismo muscular por *Sarcocystis* spp. e *Cysticercus bovis*
(*Taenia saginata*) em bovinos da Região Autónoma dos Açores

Gonçalo Jorge dos Mártires Antunes

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida
Bernardo

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

ORIENTADOR

Dr^a Ana Luísa Batista dos Santos Homem

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Parasitismo muscular por *Sarcocystis* spp. e *Cysticercus bovis*
(*Taenia saginata*) em bovinos da Região Autónoma dos Açores

Gonçalo Jorge dos Mártires Antunes

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida
Bernardo

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

ORIENTADOR

Dr^a Ana Luísa Batista dos Santos Homem

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2014

LISBOA

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Ana Luísa Homem, agradeço a orientação durante o período de estágio e por todo o conhecimento transmitido.

Ao Professor Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho, por todo o apoio, dedicação, simpatia e amizade.

Ao Eng. José António Neto Ávila, Diretor dos Serviços de Desenvolvimento Agrário da ilha Terceira e ao Dr. Francisco Lima, Chefe de Divisão de Veterinária, pela autorização concedida para o acompanhamento da equipa de inspeção sanitária.

A toda a equipa de Inspeção Sanitária do Matadouro Industrial da ilha Terceira, Dr^a Paula Cota, Dr^a Vanda Dias, Bruno e Zezinha.

À Dr^a Lídia Flor, Diretora do Laboratório Regional de Veterinária dos Açores (LRVA), por ter autorizado a realização das provas laboratoriais relativas a este trabalho nas instalações do LRVA.

À Dr^a Isilda Flor em nome do Sector de Parasitologia do LRVA, por todo apoio dado na prova de Digestão Enzimática de músculo cardíaco e diafragmático presente neste trabalho.

À Dr^a Susana Alves Bernardo em nome do Sector de Patologia do LRVA por todo apoio dado na preparação das amostras histológicas de músculo cardíaco e diafragmático necessárias para a prova de Histopatologia presente neste trabalho.

Ao Eng. Marco Barros em nome do Sector de Serologia do LRVA pelo apoio dado na obtenção e elaboração do teste ELISA presente neste trabalho.

Ao Doutor Telmo Nunes da FMV, não só pela grande ajuda na análise estatística deste trabalho, mas também pela obtenção da base de dados relativo aos movimentos animais do SNIRA e pela enorme ajuda na sua interpretação.

À Dr^a Rosalina Coelho Diretora de Serviços de Qualidade e Segurança Alimentar, à Dr^a Teresa Maria Correia Spinola Rodrigues, Chefe de Divisão de Inspeção Veterinária e Agronómica e à Dr^a Mariana Boaventura Afonso pelo fornecimento dos dados obtidos por Inspeção Sanitária, relativos à cisticercose bovina na Região Autónoma da Madeira.

Ao Eng. Abílio Dias da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) por ter fornecido o acesso à base de dados dos movimentos animais do Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos (SNIRB).

Às Dr^{as}. Margarida Arede e Eliana Lima pela ajuda, fundamental, no cruzamento das bases de dados dos movimentos animais e dos casos de cisticercose bovina na RAM.

E a todos os amigos e colegas que fiz ao longo do curso.

*Aos meus pais, irmão e muito especialmente à Sílvia Barros, porque sem o seu apoio, amizade, companheirismo e força estes últimos anos teriam sido impossíveis de ultrapassar
Por tudo o meu eterno OBRIGADO.*

Parasitismo muscular por *Sarcocystis* spp. e *Cysticercus bovis* (*Taenia saginata*) em bovinos da Região Autónoma dos Açores

RESUMO

A presente dissertação debruça-se sobre a presença dos parasitas *Sarcocystis* spp. e *Taenia saginata* no Arquipélago dos Açores. A escolha recaiu nestes parasitas pela sua importância em Saúde Pública, mas também pelo desconhecimento da sua prevalência nos Açores.

Para determinar a prevalência de *Sarcocystis* spp., amostras de coração e diafragma de 48 bovinos abatidos na ilha Terceira, foram processadas por digestão enzimática (DE) e exame histológico (EH). Detetou-se infeção por *Sarcocystis* spp. em 48 (100%) dos corações, e 35 (64,58%) dos diafragmas analisados por DE, e em 41 (85,42%) dos corações e 31 (64,58%) dos diafragmas analisados por EH. A técnica de DE do miocárdio foi a mais eficaz. Na identificação das espécies de *Sarcocystis* utilizaram-se as amostras positivas no EH, tendo apenas sido identificados cistos compatíveis com *Sarcocystis cruzi*.

Os casos de Cisticercose bovina detetados na Região Autónoma da Madeira (RAM) em animais nascidos nos Açores e a inexistência de casos descritos na Região Autónoma dos Açores (RAA) foi o mote para a pesquisa deste parasita nos Açores.

Numa primeira fase utilizaram-se os registos de reprovações por *Cysticercus bovis* da RAM entre os anos de 2007 a 2013 para determinar as prevalências totais (5,82%), dos animais nascidos na RAM (9,56%), dos nascidos nos Açores (5,24%) e dentro destes, dos que permaneceram menos de 6 semanas na RAM (0,8%), e os que permaneceram mais que 6 semanas na RAM (9,73%).

Numa segunda fase foram testados, 70 novilhos embarcados na Terceira, com destino à RAM para a presença de anticorpos anti- *Cysticercus bovis*. Dos animais testados, 9 (12,9%) apresentaram concentrações elevadas de anticorpos (>300ng/ml), 4 desses animais foram positivos a cisticercose bovina na Inspeção Sanitária.

Desta forma, estes resultados parecem confirmar que parte dos animais oriundos dos Açores detetados na RAM com cistos de *Cysticercus bovis* infetam-se na RAA.

Palavras chave: *Sarcocystis* spp., *Taenia saginata*, cisticercose bovina, Região Autónoma dos Açores, ilha Terceira

Muscle parasites by *Sarcocystis* spp. and *Cysticercus bovis* (*Taenia saginata*)
in cattle of the Azores

ABSTRACT

This dissertation focuses on the detection and quantification of the parasites, *Sarcocystis* spp. and *Taenia saginata*, in the Azores Archipelago. The choice fell on these parasites because of its importance in Food Security and Public Health, but also for the lack of knowledge of its prevalence in the Azores.

To assess the prevalence of *Sarcocystis* spp., heart and diaphragm samples from 48 bovines slaughtered in Terceira island were processed by enzymatic digestion (ED) and histologic exam (HE). *Sarcocystis* spp. were detected in 48 (100%) hearts, and 35 (64.58%) diaphragms by ED analyses, and 41 (85.42%) hearts, and 31 (64.58%) diaphragm by HE analyses. ED of myocardium was the best technique. It was only identified *S. cruzi* in the samples.

The cases of bovine cysticercosis detected in Madeira Autonomous Region (MAR) in animals from the Azores Autonomous Region (AAR), and the absence of cases in the Azores was the motto for the study.

For this purpose, we used the records of rejections by *Cysticercus bovis* in MAR between 2007 and 2013 to determine the total prevalence (5.82%), prevalence in MAR born animals (9.56%), Azorian born (5.24%) and within those, the ones that stayed less than 6 weeks in MAR (0.8%), and the ones that remained more than 6 weeks in MAR (9.73%). In conjunction with this study, 70 bulls shipped in Terceira island were tested for the presence of antibodies anti-*Cysticercus bovis*. From the tested animals, 9 (12.9%) showed high antibody concentrations (> 300 ng / ml), 4 of those animals were positive to bovine cysticercosis at Sanitarian Inspection examination.

As conclusion, it can be said that some of the animals from the Azores, detected in MAR with *Cysticercus bovis* cysts, acquired the infection at the origin.

Keywords: *Sarcocystis* spp., *Taenia saginata*, bovine cysticercosis, Azores Autonomous Region, Terceira Island

ÍNDICE GERAL

CAPITULO I – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

1.1 Introdução	1
1.2 Matadouro Industrial da Ilha Terceira	1
1.3 Laboratório Regional de Veterinária dos Açores	4

CAPITULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Parasitas da carne com potencial zoonótico	5
2.2 Parasitas musculares em bovinos	7
2.2.1 Sarcocistiose	7
2.2.1.1 Agente etiológico	7
2.2.1.2 Ciclo de vida	8
No hospedeiro intermediário	8
No hospedeiro definitivo	10
Ciclo de vida (exceção)	10
2.2.1.3 Epidemiologia	11
2.2.1.4 Sarcocistiose clínica	11
No hospedeiro intermediário	12
Em seres humanos	12
Miosite eosinofílica	13
2.2.1.5 Diagnóstico	14
Sarcocistiose muscular	14
Sarcocistiose intestinal	16
2.2.1.6 Tratamento	16
2.2.1.7 Prevenção e controlo	17
2.2.2 Toxoplasmose	18
2.2.2.1 Agente etiológico	18
2.2.2.2 Ciclo de vida	18
2.2.2.3 Toxoplasmose em bovinos	20
2.2.3 Cisticercose bovina por <i>Cysticercus bovis</i>	21
2.2.3.1 Agente etiológico	21
2.2.3.2 Ciclo de vida	21
2.2.3.3 No homem (Teniose)	23
Diagnostico	23
Tratamento	24

2.2.3.4 Nos bovinos (<i>Cisticercose</i>)	25
<i>Infeção dos bovinos</i>	25
<i>Dose-resposta em vitelos</i>	26
<i>Taxa de sobrevivência dos quistos nos músculos</i>	26
<i>Fatores de risco para os bovinos</i>	27
<i>Avaliação de risco associada aos diferentes métodos de produção</i>	28
<i>Recomendações à inspeção sanitária de acordo com os perfis de risco</i>	29
<i>Diagnóstico</i>	30
2.3 <i>Cisticercose bovina na Região Autónoma da Madeira</i>	31
2.4 <i>Produção de carne de bovino nos Açores</i>	34
<i>Características geoclimáticas</i>	34
<i>Efetivo bovino</i>	34
<i>Evolução na produção de carne de bovinos nos Açores</i>	35
<i>Matadouros da Região Autónoma dos Açores</i>	37
<i>Cisticercose nas Regiões Autónoma dos Açores</i>	37
CAPITULO III – PARASITAS MUSCULARES EM BOVINOS, <i>Sarcocystis spp.</i> E <i>Taenia saginata</i>, NA REGIÃO AUTÓNOMA DOS AÇORES: Estudo de caso	
3.1 <i>Objetivos</i>	39
3.2 <i>Estudo 1.</i>	41
3.2.1 <i>Material e Métodos</i>	41
3.2.2 <i>Resultados</i>	43
3.3 <i>Estudo 2.</i>	46
3.3.1 <i>Material e Métodos</i>	46
3.3.2 <i>Resultados</i>	47
3.4 <i>Estudo 3.</i>	52
3.4.1 <i>Material e Métodos</i>	52
3.4.2 <i>Resultados</i>	53
3.5 <i>Discussão</i>	56
3.6 <i>Conclusão</i>	61
4. BIBLIOGRAFIA	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Total de animais abatidos no MIT, durante o período de estágio	2
Tabela 2: Reprovações totais observadas durante o período de estágio no MIT, para as diferentes espécies animais.....	2
Tabela 3: Total de amostras colhidas no âmbito dos planos de rastreio e monitorização de doenças animais.....	3
Tabela 4: Resultados do número de amostras positivas a <i>Sarcocystis</i> spp. para os diferentes grupos musculares e técnicas utilizados.....	44
Tabela 5: Resultados do teste de sensibilidade para as técnicas de digestão enzimática (DE) e exame histológico (EH) nos diferentes músculos, naturalmente infetados com <i>Sarcocystis</i> spp.....	45
Tabela 6: Análise comparativa da frequência de <i>Sarcocystis</i> spp. pelas técnicas de DE e EH nos músculos testados (teste exato de McNemar).....	45
Tabela 7: Quadro-resumo referente aos abates na RAM.....	48
Tabela 8: Quadro-resumo referente ao tempo de permanência na RAM até ao abate dos bovinos oriundos da RAA.....	48
Tabela 9: Quadro-resumo referente aos casos de Cisticercose dos bovinos nascidos na RAM e RAA.....	49
Tabela 10: Grupos de animais com base no tempo de permanência na RAM até ao abate.....	54
Tabela 11: Relação entre os casos de rejeição em IS e os títulos de Ac obtidos ao embarque.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida dos <i>Sarcocystis hominis</i> e <i>S. suihominis</i>	8
Figura 2: Lesões compatíveis com miosite eosinofílica.....	13
Figura 3: Bradizoíto de <i>Sarcocystis</i> spp.....	15
Figura 4: Grupo de bradizoítos de <i>Sarcocystis</i> spp.....	15
Figura 5: Cistos de <i>Sarcocystis cruzi</i> no miocárdio de um bovino.....	15
Figura 6: Cistos de <i>Sarcocystis hominis</i>	15
Figura 7: Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	19
Figura 8: Ciclo de vida do género <i>Taenia</i> (<i>T. saginata</i> e <i>T. solium</i>).....	22
Figura 9: Prova de digestão enzimática péptico-ácida. Digestão da amostra, sobre placa aquecida a 44-46 °C.....	43
Figura 10: Bradizoíto de <i>Sarcocystis</i> spp. obtido por digestão enzimática de miocárdio de bovinos abatidos no MIT.....	44
Figura 11: Cistos de <i>Sarcocystis</i> spp. em miocárdio de bovino e diafragma observadas em cortes histológico corado coradas com HE.....	44
Figura 12: Prevalência de casos de CB na RAM, dos bovinos abatidos antes das 6 semanas de chegada à Madeira, por ilha de nascimento.....	51

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Reprovações totais por tumores durante o período de estágio.....	3
Gráfico 2: Percentagem de reprovações totais (RT%) de carcaças Por cisticercose bovina na RAM.....	32
Gráfico 3: Relação entre bovinos abatidos e saída de bovinos vivos da RAA entre 2004 e 2013.....	36
Gráfico 4: Evolução do nº de carcaças certificadas na RAA.....	37
Gráfico 5: Prevalência de CB na RAM para o total de bovinos abatidos, nRAM e Aç1 entre os anos de 2007 e 2013.....	50
Gráfico 6: Título de Ac (ng/ml) ao embarque dos bovinos nascidos na RAA e abatidos na RAM.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac – Anticorpos

Aç1 – Bovinos nascidos nos Açores, que permaneceram menos de 6 semanas na Região Autónoma da Madeira até ao abate entre 2007 e 2013

Aç2 – Bovinos nascidos nos Açores, que permaneceram mais de 6 semanas na Região Autónoma da Madeira até ao abate entre 2007 e 2013

anti-CYT-HRP – anticorpo anti-*Cysticercus* marcado

CB – Cisticercose Bovina

DE – Digestão Enzimática

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

EET – Encefalopatia Espongiforme Transmissível

EFSA – *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentos)

EH – Exame Histológico

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EUA – Estados Unidos da América

HD – Hospedeiro Definitivo

HE – Hematoxilina Eosina

HI – Hospedeiro Intermediário

HRP – *Horseradish peroxidase*

IAMA – Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas

ID – Intestino Delgado

IFATs – Imunofluorescência Indireta

IGP – Indicação Geográfica Protegida

INE – Instituto Nacional de Estatística

IS – Inspeção Sanitaria

IT – Ilha Terceira

LAT – *Latex Agglutination Test*

LRVA – Laboratório Regional de Veterinária dos Açores

ME – Miosite Eosinofílica

MIT – Matadouro Industrial da ilha Terceira

nAç – Bovinos nascidos nos Região Autónoma dos Açores e abatidos na Região Autónoma da Madeira, entre 2007 e 2013

nFRA – Bovinos nascidos fora das regiões autónomas portuguesas e abatidos na Região Autónoma da Madeira entre 2007 e 2013

nRAM – Bovinos nascidos e abatidos na Região Autónoma da Madeira, entre 2007 e 2013

OIE – *Organization Internationale des Epizooties*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RAA – Região Autónoma dos Açores

RT – Reprovações totais

SCVPH – *Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health*

SDAA – Serviços de Desenvolvimento Agrário Açores

SNIRA – Sistema Nacional de Informação e Registo Animal

SPBH – *Panel on Biological Hazards*

VP – Vacúolo Parasitóforo

WHO – *World Health Organization*

CAPITULO I – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

1.1 Introdução

O Estágio Curricular, que levou à elaboração de presente trabalho, decorreu entre os dias 2 de Novembro de 2012 e 30 de Abril de 2013, sob a orientação da Dra. Ana Luísa Homem e com a coorientação do Professor Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho, tendo lugar no Matadouro Industrial da Ilha Terceira (IT), onde o estudante acompanhou a equipa de Inspeção Sanitária nos Serviços de Desenvolvimento Agrário Açores – Terceira (SDAA) e no Laboratório Regional de Veterinária dos Açores (LRVA), nos setores de Parasitologia e Patologia.

1.2 Matadouro Industrial da Ilha Terceira

O Matadouro de ungulados da Ilha Terceira é um matadouro horizontal, no qual coexistem três linhas de abate apropriadas para cada uma das espécies abatidas nas suas instalações; bovinos, suínos, pequenos ruminantes (caprinos e ovinos). A linha de abate de bovinos tem uma capacidade de 30 animais/hora e a de suínos de 60 animais/hora. Os pequenos ruminantes são abatidos em muito menor escala.

No Matadouro Industrial da Ilha Terceira, sob orientação da Dr.^a Ana Luísa Homem, Inspetora Sanitária de carnes, o estudante desempenhou o cargo de Inspetor Sanitário de ungulados, passando pelos diversos pontos de inspeção do matadouro, supervisionado, tanto pela orientadora, como pelos restantes médicos veterinários oficiais do SDAA.

Durante o período de estágio no Matadouro de ungulados da Ilha Terceira foram abatidos 6191 bovinos, 4842 suínos, 199 caprinos e 28 ovinos (Tabela 1). Dos bovinos, 5750 foram abatidos para consumo normal, 87 foram abatidos à condição, 80 submetidos a abate de urgência e 274 a abate de animais em fim de vida produtiva. Dos suínos abatidos, 126 eram leitões, com menos de 6 meses de idade, 4609 eram porcos de engorda com mais de 6 meses, 126 eram porcas reprodutoras e 2 eram varrascos. Dos pequenos ruminantes 162 eram cabritos, 20 cordeiros, 37 caprinos com mais de 18 meses e 8 ovinos com mais de 18 meses. As causas de reprovações totais (RT) durante o período de estágio estão descritas na Tabela 2.

Tabela 1: Total de animais abatidos no MIT, durante o período de estágio.

Espécie	Nº de animais
Bovinos	6191
Suínos	4842
Caprinos	199
Ovinos	28

Tabela 2: Reprovações totais observadas durante o período de estágio no MIT, para as diferentes espécies animais.

Causa de rejeição	Bovinos	Suínos	Caprinos	Ovinos
Anemia, caquexia, Emaciação	26	3	-	-
Síndrome febril, debilidade, Causa infecciosa	6	-	-	-
Contusões ou hematomas	1	-	-	-
Tumores	72	-	-	-
Metrite aguda, fetos putrefactos	2	-	-	-
Fraturas	-	1	-	-
Osteomielite	3	6	-	-
Carne escura ao corte	-	-	-	-
Pleuropneumonia do porco	-	5	-	-
Peritonite	3	7	-	-
Pneumonia	-	6	-	-
Abcessos Pulmonares	-	3	-	-
Outras	16	9	-	-
Total	129	40	0	0
Taxa de rejeição (%)	2,18	0,83	0,00	0,00

Durante o período de estágio, a principal causa de RT nos bovinos abatidos no MIT foram os tumores, com 55% do total de reprovações, seguida das RT por anemia, caquexia, emaciação, com 20%. A distribuição do local dos tumores encontrados durante o período de estágio foi de 32 na bexiga, 24 na terceira pálpebra (olho), 5 na pele e 6 noutros locais (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Reprovações totais por tumores durante o período de estágio.



À data do estágio, todos os bovinos com mais de 48 meses abatidos para consumo humano ou com mais de 36 meses no caso de abates urgentes e animais com sinais clínicos de doença no exame *ante-mortem*, eram sujeitos a recolha de tronco cerebral para rastreio de Encefalopatia Espongiforme Transmissível (EET), (Decisão da Comissão 2008/908/CE de 28 de Novembro).

Os pequenos ruminantes com mais de 18 meses ou que apresentassem um ou dois incisivos definitivos rasgados, também foram sujeitos a colheita de tronco cerebral para rastreio de EET de acordo com a mensagem nº 850 da Direção de Serviços do Planeamento DGV de 28-12-2009.

As amostras de músculos (diafragma) para pesquisa de *Trichinella* spp., foram colhidas de todos os suínos com mais de 6 meses de idade ao abate conforme o Regulamento (CE) Nº 2075/2005 de 5 de Dezembro.

As amostras colhidas de troncos cerebrais dos ruminantes e de diafragma dos suínos, foram enviadas para o Laboratório Regional de Veterinária, para teste de rastreio e monitorização de doenças animais (Tabela 3).

Tabela 3: Total de amostras colhidas no âmbito dos planos de rastreio e monitorização de doenças de animais.

	Tronco Cerebral	Amostra Muscular
Bovinos	1122	-
Suínos	-	4716
Caprinos	37	-
Ovinos	8	-

1.3 Laboratório Regional de Veterinária dos Açores

No Laboratório Regional de Veterinária dos Açores, o estudante realizou trabalho laboratorial necessário à elaboração da presente dissertação de Mestrado. No Sector de Parasitologia foram processadas as amostras de miocárdio e diafragma de bovinos, colhidas no MIT, através do método de digestão enzimática para a pesquisa de bradizoítos de *Sarcocystis* spp. No sector de Patologia o estudante colaborou na preparação e observação dos cortes histológicos dos miocárdios e diafragmas selecionados para o estudo, assim como das amostras suspeitas de cisticercose bovina (CB) encontradas na inspeção sanitária no MIT durante o período de estágio.

CAPITULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Parasitas da carne com potencial zoonótico

Ninguém quer ouvir falar de parasitas na carne que come, preferimos acreditar que as “bichas-solitárias” (*Taenia* spp.) e nemátodos como *Trichinella* spp. são seres do passado. (Villeneuve,2001). Mas, infelizmente, carne infetada com parasitas continua a ser uma realidade dos nossos dias, sendo que as parasitoses da carne são uma das mais importantes causas de doença e de perdas económicas a nível global (World Health Organisation [WHO], 1984; Gamble & Murrell, 1998; Food and Agriculture Organization [FAO]/WHO 2014)

As infeções humanas raramente são detetadas e/ou reportadas, mas com um número crescente de pessoas imunossuprimidas, a popularidade de comidas exóticas, o aumento das importações de bens alimentares e a facilidade de viajar, atualmente estamos mais expostos a novas infeções que no passado. A sensibilização para a questão continua a ser o fator essencial para a nossa proteção (Villeneuve,2001).

Diversas espécies, ou grupos de parasitas, podem ser encontradas em diferentes músculos de animais utilizados para consumo humano. Protozoários como *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp. podem ser encontrados em diversos animais de produção e/ ou selvagens. Algumas formas larvares de Cestodes, como as da *Taenia solium*, *T. saginata* e *Diphyllobothrium* spp. infetam, respetivamente, o porco, os bovinos e os peixes como o salmão. E nemátodos, como os do género *Trichinella* que tem 8 espécies com reconhecida patogenicidade para o homem: *Trichinella britovi*, *T. murrelli*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. pseudospiralis*, *T. spiralis* e *T. zimbabwensis*, que podem infetar diversos mamíferos, aves e até répteis (Pozio, 2001).

Os nematodes do género *Trichinella* podem infetar tanto animais silvestres como domésticos, sendo *Trichinella spiralis* a espécie mais conectada com o ciclo doméstico, sendo a principal fonte de infeção para o homem o porco. Devido ao seu peculiar ciclo de vida (auto-heteroxeno), é dos poucos parasitas multicelulares que tem a capacidade de desenvolver todas as fases do seu ciclo de vida num só animal, funcionando este como hospedeiro definitivo (HD) e hospedeiro intermediário (HI). O género *Trichinella* depende, para a sua sobrevivência, não só da predação como também de comportamentos de canibalismo por parte dos seus hospedeiros. Assim sendo, os seus hospedeiros poderão ser carnívoros e omnívoros, silvestres ou domésticos. Apesar de Smith et al., (1990), citado por Gamble & Murrell (1998), terem conseguido, experimentalmente, estabelecer a infeção de bovinos com *T. spiralis spiralis* e *T. spiralis nativa*, teoricamente, os herbívoros não contraem triquinelose naturalmente. No entanto, vários surtos de triquinelose humana estão associados ao consumo

de carne de cavalo (Motyka, 1976; Guilhon, 1977; Bellani, Mantovani, Pampiglione & Filippini, 1978; Quinet, 1987) e, mesmo, um surto na Alemanha relacionado com o consumo de carne seca de camelo importada do Egito (Bommer, Kaiser, Mergerian & Pottkamer, 1980).

A principal fonte de infeção para o homem é a carne de porco, que estes contraem através da ingestão de roedores e/ou pelos hábitos de canibalismo que têm, como, por exemplo, o comer das caudas uns dos outros nas produções intensivas. Outra fonte de infeção para o homem é a caça, principalmente de javali, que funciona como reservatório natural (Pozio, 1998; Devine, 2003).

Como parasitas da carne no seu sentido mais lato, temos ainda o género *Anisakis*, *sensu lato*, que tem como hospedeiros intermediários, praticamente, todas as espécies de peixes, sendo o responsável pela síndrome da larva migrante visceral no homem. Esta síndrome pode, ser designada por “anisakidose”, se a infeção for provocada por nematodes da família Anisakidae, ou por “anisakiose” no caso da infeção por nemátodos do género *Anisakis* (Audicana & Kennedy, 2008). A síndrome da larva migrante visceral por *Anisakis* spp. tem cada vez mais expressão a nível mundial, com aproximadamente 20 000 casos humanos no ano de 2010 (Hochberg & Hamer, 2010). O rápido crescimento de mercados internacionais e a demanda massiva de pratos exóticos, tais como sushi, sashimi e peixe fumado (arenque/ salmão), têm sido os responsáveis pelo aumento de casos, mesmo em países onde não havia registos de contato com estes parasitas (Chai, Darwin Murrell & Lymbery, 2005; Audicana & Kennedy, 2008).

A maioria destes parasitas, quando presentes na carne, é de difícil ou mesmo impossível deteção a olho nu. Os quistos de *Toxoplasma* têm 0.1mm de diâmetro, os de *Sarcocystis* variam com a espécie, mas, por exemplo, os de *S. hominis* atingem os 4mm e as larvas enquistadas de *Trichinella* spp. medem cerca de 1mm. Outras espécies podem ser, facilmente, detetadas na inspeção visual. Os cisticercos de *Taenia solium* denominados *Cysticercus cellulosae*, são ovais com aproximadamente 5-8 por 3-6mm, com uma vesícula preenchida de líquido e com um escólex invaginado, com 4-5mm de diâmetro, facilmente, identificável. Os cisticercos de *T. saginata*, denominados *Cysticercus bovis*, são semelhantes, mas apresentam maiores dimensões (7-10 por 4-6mm). As larvas de *Diphyllobothrium latum* podem estar enquistadas ou livres, têm de 1 a 4mm de comprimento e estrias transversais translúcidas ou de tom branco azulado. As larvas da Família Anisakidae têm uma forma cilíndrica, são translúcidas e medem de 10 a 50mm.

Relativamente à carne de bovino, os parasitas mais suscetíveis de causar doença no homem, quebras de produção, rejeição total ou parcial de carcaças e, conseqüentemente, perdas económicas, são as diferentes espécies do género *Sarcocystis*, que têm os bovinos como hospedeiro intermediário e a *Taenia saginata*, sob a forma de larva *Cysticercus bovis*.

Outro parasita propenso a infetar tecido muscular de bovinos é o protozoário *Toxoplasma gondii*, que apesar do papel dos bovinos como transmissor desta zoonose ser ainda desconhecido (Dubey, Hill & Jones, 2005), diversos autores demonstraram níveis por vezes elevados de seroprevalência deste parasita em bovinos. São os casos de Daguer et al., (2004) (41.4%), Ogawa, Freire, Vidotto, Gondim & Navarro, (2005) (26.0%), Albuquerque et al., (2005) (14.77%) Spagnol et al., (2009) (11.83%), Inpankaew et al., (2010) que obteve prevalências de 9.4% e 17% para os testes de diagnóstico de *latex agglutination test* (LAT), e *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), respetivamente, Sanati et al., (2012) (71.3%), e Fajardo et al., (2013) (2.68%).

2.2 Parasitoses musculares em bovinos

2.2.1 Sarcocistiose

2.2.1.1 Agente etiológico

O género foi descrito pela primeira vez em 1843, por Miescher ao identificar quistos brancos filiformes na musculatura estriada, num rato doméstico. Nos 20 anos seguintes, o parasita foi simplesmente designado como túbulos de Meischer. Em 1865, estruturas similares foram encontradas em porcos, mas foram precisos mais 34 anos para que o nome *Sarcocystis miescheriana* fosse proposto para identificar o parasita (Dubey, Speer & Charleston, 1989a). Durante muito tempo, questionou-se se o novo género, *Sarcocystis*, pertenceria ao *Reino Protozoa* ou ao *Fungi*. A possibilidade de que os *Sarcocystis* pertencessem ao *Reino Fungi* surgiu, porque apenas o estágio de sarcocisto era conhecido e ao colocá-lo em diversos meios de cultura surgiam, por vezes, hifas e micélios, devido a contaminação dos meios. Foi somente em 1967, 124 anos depois do primeiro registo de *Sarcocystis*, que as estruturas fusiformes (bradizoítos), que se encontram dentro dos quistos, foram estudadas, recorrendo à microscopia eletrónica. Nesse momento, foi concluído que os organelos neles encontrados eram semelhantes aos observados nos protozoários do Filo Apicomplexa, como os dos géneros *Toxoplasma* e *Eimeria* (Senaud, 1967).

Atualmente, o género *Sarcocystis* compreende mais de 100 espécies identificadas, capazes de infetar mamíferos, aves e animais poiquilotérmicos. Este género tem ciclo de vida predador-presa obrigatório (de dois hospedeiros) (Figura 1). A fase assexuada do ciclo desenvolve-se, apenas, no hospedeiro intermediário (HI) que, na natureza, é normalmente uma presa e a fase sexuada desenvolve-se, somente, no hospedeiro definitivo (HD), um predador ou carnívoro (Dubey & Lindsay, 2006).

2.2.1.2 Ciclo de vida

Para cada espécie do género *Sarcocystis* há um HI e HD específico. Por exemplo, para as três espécies de *Sarcocystis*, que têm os bovinos como HI, *Sarcocystis cruzi*, *S. hirsuta* e *Sarcocystis hominis* (Dubey et al., 1989a), são hospedeiros definitivos, respetivamente, os canídeos, os felinos e os primatas. Os bovinos servem igualmente de HI para *S. sinensis*, parasita para o qual ainda não foi identificado o HD (Moré et al., 2014). As espécies de *Sarcocystis* são, geralmente, mais específicas para o hospedeiro intermediário que para o definitivo, como é o caso de *S. cruzi*, que tem como HI o boi e o bisonte, ao passo que o cão, o lobo, o coiote, o chacal, o guaxinim e a raposa podem desempenhar o papel de hospedeiros definitivos (Dubey & Lindsay, 2006).

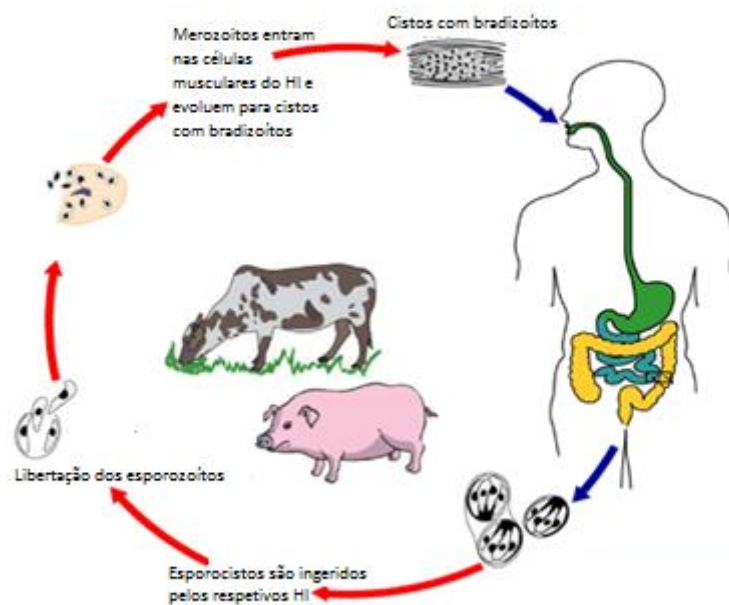


Figura 1: Ciclo de vida de *Sarcocystis hominis* e *S. suihominis*, adaptado do “Centers for Disease Control and Prevention”: www.cdc.gov

No hospedeiro intermediário

Dependendo da espécie envolvida, o ciclo de vida do parasita sofre ligeiras alterações, mas genericamente, o hospedeiro intermediário infeta-se ingerindo esporocistos presentes no alimento ou na água. No intestino delgado os esporozoítos libertam-se dos esporocistos e entram na corrente sanguínea do HI e 7 a 15 dias após a ingestão formam-se, por um

processo de divisão celular denominado esquizogonia, esquizontes de primeira geração nas células endoteliais das artérias. Os esquizontes de segunda geração surgem entre 19 a 46 dias pós infecção, principalmente ao nível dos capilares, virtualmente por todo o corpo do animal. Os merozoítos começam a ser observados 24 a 46 dias depois da ingestão, nas células sanguíneas mononucleares.

Os esquizontes de primeira e segundas gerações encontram-se dentro de células do hospedeiro intermediários e não estão rodeados por um Vacúolo Parasitóforo (VP). O número de esquizogonias e o tipo de célula onde se dão são diferentes conforme a espécie de *Sarcocystis*. Por exemplo, todas as espécies de *Sarcocystis* que têm os animais domésticos de grande porte como hospedeiro intermediário (ovelha, cabra, vaca e porco) têm esquizogonias de primeira e segundas gerações no endotélio vascular, ao passo que, em HI pequenos (ratos), só se dá uma esquizogonia e geralmente ocorre nos hepatócitos (Dubey et al., 1989a).

Os merozoítos, que se formam a partir dos esquizontes, no caso do género dos *Sarcocystis* têm organelos semelhantes aos de outras coccídeas com a exceção da ausência de róptrias, organelos exclusivos dos Apicomplexa. (Dubey et al., 1989a).

Os merozoítos vão penetrar as células do hospedeiro, e o merozoíto intracelular, que se encontra rodeado por um VP, passa a ter uma forma arredondada/ovóide chamada de metrócito (célula mãe), dividindo-se rapidamente, produzindo vários metrócitos, que eventualmente se diferenciam em zoítos em forma de banana, chamados de blastocistos, ou cistozoítos.

Os sarcocistos, que se localizam sempre dentro de um VP, no citoplasma das células do HI, são constituídos por um cisto que rodeia os metrocitos e/ou bradizoítos. A estrutura e espessura da parede do cisto diferem entre espécies e estados de maturação de cada cisto de *Sarcocystis* (Dubey et al., 1989a). Histologicamente, a parede do sarcocisto pode ser; lisa, estriada ou eriçada ou hirsuta (do inglês “hirsute”), ou apresentar protruções ramificadas, de elevado interesse taxonómico. Internamente, podemos observar grupos de zoítos, aglomerados dentro do cisto ou separados em grupos, por septos com origem na parede do sarcocisto (Dubey & Lindsay, 2006).

Alguns sarcocistos maduros podem conter metrocitos na periferia, mas com o passar do tempo torna-se totalmente composto por bradizoítos, o estágio infetante para o hospedeiro definitivo. Os sarcocistos tornam-se infetantes aproximadamente 75 dias pós ingestão de esporocistos por parte do HI, apesar de haver uma considerável variação consoante a espécie de *Sarcocystis* envolvida. As formas imaturas de sarcocistos, contendo apenas metrocitos e esquizontes não são infetantes para o HD (Dubey & Lindsay, 2006).

No hospedeiro definitivo

O hospedeiro definitivo infeta-se ao ingerir tecidos do HI contendo sarcocistos maduros. Os bradizoítos libertam-se do sarcocisto pela ação da digestão no estomago do predador e penetram a mucosa do intestino delgado, diferenciando-se em gamontes e posteriormente gâmetas masculinos (microgâmetas) e femininos (macrogâmetas). Após a fertilização, desenvolve-se uma parede em volta do zigoto, evoluindo, este, para oocisto. Todo este processo pode ser completado em 24 horas (Dubey & Lindsay, 2006).

Os oocistos de *Sarcocystis* esporulam na lâmina própria e como possuem uma parede fina (< 1µm), rompem-se facilmente, libertando os esporocistos no lúmen intestinal, acabando estes por serem expelidos nas fezes. Os períodos pré-patente e patente variam conforme a espécie em causa, mas na maioria dos *Sarcocystis* os oócitos/esporocistos são encontrados nas fezes dos HD 7 a 14 dias pós ingestão dos sarcocistos (Dubey & Lindsay, 2006).

Ciclo de vida (exceção)

O *S. neurona* é uma espécie do género *Sarcocystis* que não segue o ciclo de vida descrito anteriormente. É, também, uma das espécies mais patogénicas do género, sendo o agente associado à mieloencefalomielite protozoária equina (EPM) (Dubey Lindsay & Saville, 2001). Os cavalos são considerados um hospedeiro aberrante desta espécie, porque apenas se encontram esquizontes nos seus tecidos (Dubey, Chapman & Rosenthal, 2006).

Ao contrário de outras espécies de *Sarcocystis*, os esquizontes de *S. neurona* ocorrem em células neurais em vez de no endotélio vascular, e podem permanecer no sistema nervoso central (SNC) vários meses. Os sarcocistos desta espécie são encontrados em gatos domésticos, gambás listrados (*Didelphis albiventris*), guaxinins, lontras marinhas, e tatus. Os gambás (*Didelphis virginianus* e *Didelphis abbreventis*) são os seus HD mais frequentes. A mieloencefalite associada a *S. neurona* já foi reportada em cavalos, zebras, póneis, gambás, guaxinins, gatos, cães, lince, martas e mamíferos marinhos (Dubey et al., 2001; Dubey et al., 2006).

S. canis é outra espécie do género que apresenta um ciclo de vida ainda desconhecido. (Dubey et al., 2006). Ainda não se sabe nada sobre as fases de sarcocisto e de reprodução sexuada e quais os hospedeiros definitivos. A fase de esquizontes é a única conhecida. Este parasita tem estado associado a hepatites fatais em leões-marinhos, cães, ursos negros, ursos pardos, um cavalo e um golfinho (Dubey & Lindsay, 2006).

2.2.1.3 **Epidemiologia**

A infecção por espécies do género *Sarcocystis* está generalizada em todo o globo e em diversas espécies animais (Dubey et al., 1989a). Uma variedade de fatores permite essa elevada prevalência, tais como: um animal poder servir de hospedeiro a diversas espécies de *Sarcocystis*; há vários hospedeiros envolvidos na transmissão do género; elevado número de esporocistos expelidos pelo HD; os oocistos e esporocistos desenvolvem-se na lâmina própria e são libertados por um período de tempo muito alargado (meses); os oocistos e esporocistos são resistentes ao congelamento; cada vez que um HD ingira carne infetada irá iniciar um novo ciclo e ao facto de os oocistos de *Sarcocystis*, contrariamente aos da maioria das coccídeas, serem expelidos já na forma infetante, tornando-os mais eficientes (Dubey & Lindsay, 2006).

Num estudo levado a cabo na Índia, oocistos de *S. suihominis* foram identificados nas fezes de 14 crianças, de um grupo de 20, com idades compreendidas entre os 3 e 12 anos (Banerjee, Bhatia & Pandit, 1994), indicando o consumo de carne de porco crua ou mal confeccionada, pois o *S. suihominis* só é transmitido ao ser humano através de carne de porco infetada. Noutro estudo, também na Índia, com crianças de 3 a 5 anos residentes numa favela, detetou-se que consumiam carne virtualmente crua e que muitos porcos dessa área estavam parasitados com sacocistos de *S. suihominis* (Solanki, Shrivastava & Shah, 1976).

Na Europa, onde o consumo de carne crua e mal cozinhada de vaca é relativamente comum, a probabilidade de haver infecção por *S. hominis* é elevada (Dubey et al., 1989a).

2.2.1.4 **Sarcocistiose clínica**

Nem todas as espécies de *Sarcocystis* provocam doença ao seu hospedeiro, pois geralmente os parasitas do género *Sarcocystis* não são patogénicos para o hospedeiro definitivo e algumas espécies também não o são para o HI (Dubey et al., 1989a).

Por regra, as espécies que têm os canídeos como hospedeiros definitivos são mais patogénicas para o HI, do que aquelas que têm origem nos felinos. Por exemplo, as espécies *S. cruzi*, *S. capracanis* e *S. tenella*, são, respetivamente as espécies mais patogénicas para bovinos, caprinos e ovinos e têm todas em comum o facto de terem o cão como HD (Dubey et al., 2006).

No hospedeiro intermediário

Em infecções com uma dose superior a 50 000 esporocistos, sinais como febre, anorexia, anemia, emaciação, perda de peso e de pelo, particularmente a nível da cauda, podendo levar à morte, podem aparecer após três a quatro semanas. Pode levar também a abortos e a atrasos no desenvolvimento. À medida que os sarcocistos evoluem para sarcocistos maduros os sinais clínicos tornam-se menos evidentes. Nos animais que morrem na fase aguda da doença, aparecem lesões macroscópicas, como edema, hemorragias e atrofia do tecido adiposo. As hemorragias são mais evidentes na serosa das vísceras, nos músculos cardíaco e esquelético e na esclera, variando de petéquias a equimoses com vários centímetros de diâmetro. Microscopicamente, observam-se lesões como necrose, edema e infiltrações de células mononucleares em diversos órgãos. Durante a fase crónica, as lesões restringem-se ao músculo e consistem em miosite não supurativa devida à degeneração dos sarcocistos (Dubey & Lindsay, 2006).

Em seres humanos

O homem é o hospedeiro definitivo de *S. hominis* e *S. suihominis*, servindo de HI acidental de várias espécies ainda não identificadas (Dubey, Speer & Fayer, 1989b; Dubey, 2005). Os sintomas variam com a espécie de *Sarcocystis* em questão e com os órgãos parasitados. A sarcocistiose intestinal ocorre quando o homem é o HD do ciclo e implica a ingestão de carne de vaca ou porco “mal passada”, parasitada com sarcocistos de *S. hominis* ou *S. suihominis* respetivamente. Os sintomas associados à sarcocistiose intestinal são: náuseas; dores abdominais e diarreia. Cortes histológicos do intestino de pacientes com sarcocistiose intestinal revelam os estágios sexuais do parasita (Bunyaratvej, Bunyawongwiroj & Nitiyanant, 1982).

Voluntários alemães que ingeriram carne crua de porco infetada natural e experimentalmente com *S. suihominis*, desenvolveram sintomas de hipersensibilidade, como náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia e dispneia num período de 6 a 48 horas após a ingestão (Heydorn, 1977). Noutros estudos experimentais recolheram-se esporocistos nas fezes dos voluntários 11 a 13 dias após a ingestão de carne (Banerjee et al., 1994; Dubey, 2005).

Estão descritos alguns casos de sarcocistiose muscular em humanos (Beaver, Gadgil & Morera, 1979), que apresentavam um quadro sintomatológico de mialgia persistente, episódios de fraqueza muscular, nódulos subcutâneos, dermatomiosite, erupções pruriginosas, febre, broncospasmos, linfadenopatia transitória, com eosinofilia e aumento dos níveis de creatina quinase (CK) relacionada com a degradação muscular. Frequentemente a

associação desses sintomas a uma viagem ou residência num país tropical pode levantar a suspeita de sarcocistiose muscular (Fayer, 2004).

Um desses casos é referente a 7 militares dos Estados Unidos da América (EUA) que, efetuaram um exercício militar na Malásia e no regresso aos EUA apresentaram sintomas que levantaram a suspeita de sarcocistiose muscular. Após uma biópsia de músculo-esquelético, todos os militares apresentaram sarcocistos de uma espécie de *Sarcocystis* desconhecida (Arness, Brown, Dubey, Neafie & Granstrom, 1999a).

Miosite eosinofílica

A miosite eosinofílica (ME) é uma condição inflamatória específica do músculo estriado, atribuída à acumulação de eosinófilos nesse tecido (Dubey et al., 1989a; Wouda, Snoep & Dubey, 2006). Esta condição tem sido observada maioritariamente em bovinos, ocasionalmente, em ovinos e raramente em suínos e equinos. Os animais afetados são normalmente clinicamente sãos e as lesões de ME são achados de matadouro. As lesões macroscópicas consistem em áreas que vão do esverdeado a amarelo pálido que podem chegar aos 15 cm de extensão (Figura 2). Ainda não se sabe ao certo a sua patogenia e nunca foram encontradas em necrópsia de bovinos infetados experimentalmente (Dubey et al., 1989a). A elevada prevalência de *Sarcocystis* spp. dos bovinos, devido a infeção natural, dificulta a determinação deste parasita como a causa de ME, apesar da presença de cistos degenerados nas lesões (Wouda et al., 2006).

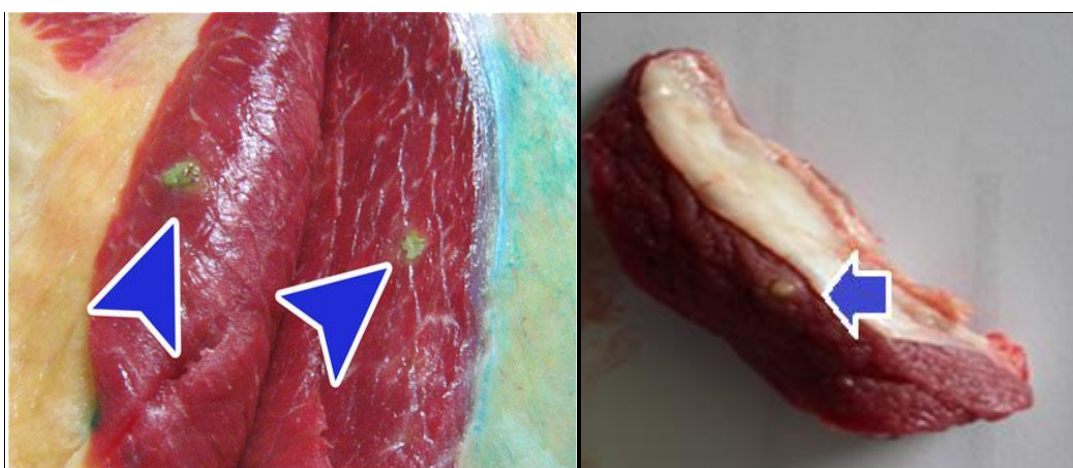


Figura 2: Lesões compatíveis com miosite eosinofílica (seta azul), no músculo de um membro anterior (figura da esquerda: <http://www.cresa.cat/blogs/sesc/miositis-piogranulomatosa-eosinofilica-per-sarcocystis-spp/?lang=en>) e no masséter de um bovino abatido no matadouro da ilha Terceira (figura da direita)(Original).

A rejeição de carcaças devido a lesões de ME ou sarcocistiose macroscópica (*S. hirsuta*) pode acarretar perdas económicas significativas (Imes & Migaki, 1967; Dubey, Udtujan & Cannon, 1990). Num estudo, levado a cabo em matadouros nos EUA, entre 1965 e 1966, 974 de 1622402 (0,06%) das carcaças inspecionadas foram rejeitadas devido a ME (Imes & Migaki, 1967).

2.2.1.5 **Diagnóstico**

Sarcocistiose muscular

A lista dos métodos analíticos oficiais de diagnóstico de sarcocistiose muscular em animais de produção encontra-se publicada no manual do *Office Internationale des Epizooties* (OIE) (OIE Manual, 2008/Regulation (EC) Nº 854/2004).

O diagnóstico *ante-mortem* pode, apenas, ser efetuado através de exame histológico de músculo colhido por biópsia (Dubey et al., 1989a; Tenter, 1995; Markus, van der Lugt & Dubey, 2004). A presença de formas imaturas de sarcocistos, contendo metrocitos, sugere uma infeção recente, quando se encontram formas maduras, indica que a infeção é antiga (Dubey et al., 1989a).

A deteção *post-mortem* de casos de sarcocistiose em animais de produção é efetuada durante a inspeção sanitária oficial nos matadouros de acordo com o Regulamento (CE) Nº 854/2004. Para além da inspeção visual, os únicos cortes de músculo requeridos para os bovinos são: a incisão dos masséteres externos e internos (não aplicável a animais com menos de seis semanas de idade) e o corte longitudinal do coração, para animais de todas as idades (Taylor et al., 2010).

A inspeção visual realizada no matadouro identifica lesões macroscópicas, não necessariamente causadas por sarcocistos. Para determinar o envolvimento de protozoários do género *Sarcocystis* com as lesões é necessária a implementação de métodos específicos. Do mesmo modo, a identificação da espécie envolvida deve ser averiguada, pois só assim podemos determinar se estamos perante uma potencial zoonose (*S. hominis* no caso dos bovinos e *S. suihominis* de suínos) ou uma espécie cujo HD não seja o Homem.

A digestão enzimática de tecidos (músculo) é uma técnica rápida e pouco dispendiosa que permite a identificação de bradizoítos de *Sarcocystis* spp. (Figuras 3 e 4). Pode ser utilizada tanto em amostras de um único animal, como em amostras de grupo. No entanto, não permite a identificação da espécie envolvida na infeção (Vangeel et al., 2007).

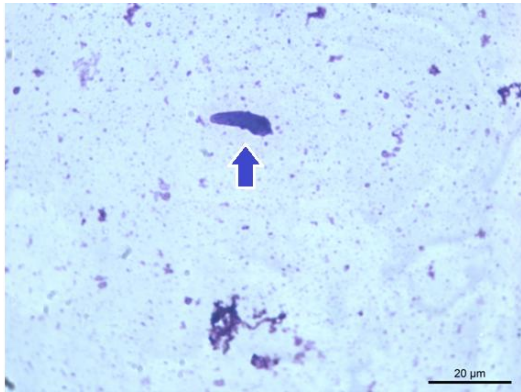


Figura 3: Bradizoíto de *Sarcocystis* spp. (seta azul) obtidos por digestão enzimática de miocárdio de bovinos abatidos no MIT (Original).

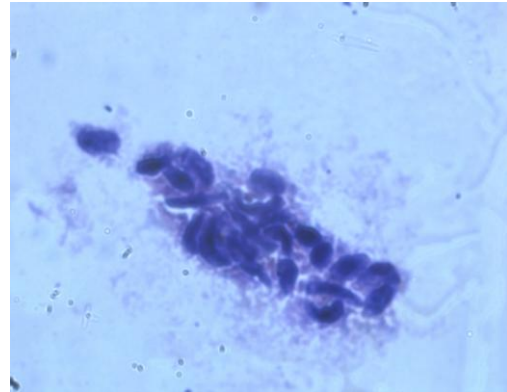


Figura 4: Grupo de bradizoítois de *Sarcocystis* spp. obtidos por digestão enzimática de miocárdio de bovinos abatidos no MIT (Original).

A observação microscópica de cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE) serve para identificar determinadas características, como a estrutura e espessura da parede do cisto ou a disposição dos zoítos dentro do sarcocisto, específicas para cada espécie. Por exemplo, no caso de infeções em bovinos, os cistos de *S. cruzi* distinguem-se dos de *S. hirsuta*, *S. hominis* e *S. sinensis* pelos primeiros terem uma parede fina (Figura 5) e os outros uma parede espessada (Figura 6) (Dubey & Lindsay, 2006). Contudo, tem baixa sensibilidade devido ao limite da área de tecido que pode ser examinado e as características físicas identificativas da espécie poderem variar consoante a idade do sarcocisto, o tipo de células do hospedeiro e o método de fixação empregue (Fayer, 2004). Para a distinção entre espécies, o método mais fiável é o da microscopia eletrónica, que permite uma melhor distinção da estrutura da parede do sarcocisto e a identificação dos organelos dos metrocitos e bradizoítois (Fayer, 2004).

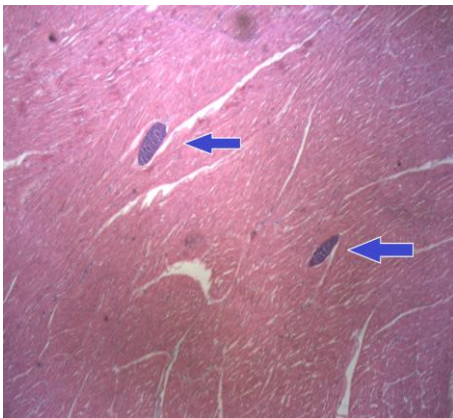


Figura 5: Cistos de *Sarcocystis cruzi* no miocárdio de um bovino abatido no MIT (Original).

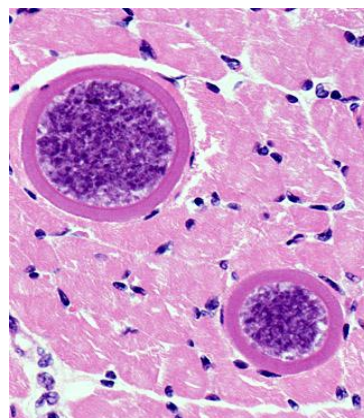


Figura 6: Cistos de *Sarcocystis hominis*, adaptado de www.pasozyty.com

Técnicas moleculares têm vindo a ser empregues para a identificação de espécies do género *Sarcocystis*, a partir de bradizoítos isolados por digestão enzimática de tecidos (Gonzalez et al., 2006; Vangeel et al., 2007) ou em combinação com cortes histológicos (Pritt et al., 2008).

Sarcocistiose intestinal

O diagnóstico da sarcocistiose intestinal faz-se por diagnóstico coprológico, através da observação ao microscópio ótico do material resultante da centrifugação e flutuação em solução saturada de sacarose ou em sulfato de zinco das fezes do hospedeiro definitivo (Menezes & Lopes, 1995) Os esporocistos ou oocistos de *Sarcocystis* aparecem totalmente esporulados nas fezes (Dubey & Lindsay, 2006).

2.2.1.6 Tratamento

Até à data, não estão descritos tratamentos curativos ou profiláticos eficazes para a sarcocistiose intestinal tanto para o homem, como para os animais. Os fármacos anti-coccídeos disponíveis no mercado, não apresentam resultados satisfatórios (Chhabra & Samantaray, 2013). Contudo, as infeções são por regra auto-limitantes e de curta duração na maioria dos casos (Fayer, 2004). Estudos utilizando co-trimoxazol (Croft, 1994) e furazolidona (Mensa, Gatell, Jimenez de Anta & Prats, 1999) para o tratamento de casos de sarcocistiose intestinal no homem foram inconclusivos. Do mesmo modo, para a miosite, a vasculite e as lesões relacionadas com sarcocistiose muscular, em seres humanos, não foram aprovadas profilaxias nem terapêuticas eficazes (Fayer, 2004). van den Enden, Praet, Joos, Van Gompel & Gigasse (1995) descreveram um caso bem sucedido de um paciente tratado com cotrimoxazole (Trimethoprim/sulfamethoxazole). Num surto de miosite eosinofílica aguda ocorrida em humanos (Arness, Brown & Dubey, 1999b) foi utilizado albendazol com relativo sucesso, mas ainda são necessários testes controlados para provar a sua eficácia. Suspeita-se que a utilização de terapia imunossupressora para reduzir a gravidade de reações inflamatórias em casos de vasculite e miosite, possa facilitar a proliferação parasitária, mas esta correlação ainda não foi provada cientificamente. A eficácia da pirimetamina ou outros fármacos utilizados no combate a protozoários aparentados, como *Toxoplasma gondii* é igualmente desconhecida (Fayer, 2004).

Devido à escassez de casos reportados de sarcocistiose muscular em seres humanos e à inexistência de estudos controlados, não há uma base de avaliação e assim não se pode chegar a um consenso sobre um protocolo eficaz (Fayer, 2004).

2.2.1.7 **Prevenção e controlo**

Estudos experimentais em vitelos e cordeiros, utilizando coccidiostáticos (amprolium e salinomicina) como profilaxia, tiveram bons resultados em prevenir o aparecimento de sintomas graves e morte em animais experimentalmente infetados (Fayer & Johnson, 1975; Leek & Fayer, 1980; Leek & Fayer, 1983). Contudo, o método mais eficaz para controlar a sarcocistiose é a prevenção, cortando o ciclo de vida do parasita. Nos animais de produção (HI), deve-se prevenir a ingestão dos esporocistos excretados nas fezes dos HD que contaminam água, alimento e o ambiente onde vivem. Devido ao grande número de espécies de *Sarcocystis* que podem infetar os animais de produção, os diversos HD que podem disseminar esporocistos de *Sarcocystis* e a grande resistência destes no meio ambiente, tornam esta tarefa virtualmente impossível. Desta forma, o método mais eficaz de cortar o ciclo parasitário é prevenir a infeção do HD, que pode ser facilmente conseguida ao cozinhar e/ou congelar a carne dos HI, matando desse modo os bradizoítos contidos nos sarcocistos (Fayer, 2004).

Saleque, Juyal & Bhatia (1990) num estudo efetuado na Índia consideraram a carne de porco com *Sarcocystis* segura para ser consumida por canídeos após ser cozinhada a 60, 70 e 100 °C durante 20, 15 e 5 min respetivamente e a congelação de carne de porco a -4 e -20 °C por 48 e 24 h, respetivamente, também se mostrou eficaz na destruição dos bradizoítos.

Um estudo levado a cabo por Leek e Fayer em 1978 demonstrou a capacidade da confeção e congelamento da carne de bovino e produtos processados a partir desta no controlo da sarcocistiose intestinal em cães. Nacos frescos cozinhados, bem como bife de hamburgers “mal passados”, continham bradizoítos infetantes para cães, enquanto, produtos cozinhados e congelados não provocaram infeção (Leek & Fayer, 1978).

Para prevenir que o homem se infete com sarcocistiose muscular, deve-se prevenir a ingestão de esporocistos de *Sarcocystis* spp. que tenham os primatas como HI. A fonte de esporocistos mais provável é a água contaminada por fezes de carnívoros ou omnívoros (que sirvam de HD para a espécie em questão) ou alimentos lavados ou irrigados com águas contaminadas (Fayer, 2004). Quando há suspeita da água estar contaminada, a fervura é o melhor método de assegurar a sua desinfeção. Em relação aos alimentos suspeitos, estes devem ser evitados ou cozinhados adequadamente antes de ingeridos (Fayer, 2004).

2.2.2 Toxoplasmose

2.2.2.1 Agente etiológico

O agente causador da toxoplasmose é o protozoário *Toxoplasma gondii*, pertencente ao Reino *Protista*, Filo *Apicomplexa*, Ordem *Eucoccidiida* e Família *Sarcocystidae* (Dubey & Lindsay, 2006). É uma coccídia intracelular obrigatória, que infecta naturalmente o homem, e os animais homeotérmicos, tanto selvagens como domésticos. Os hospedeiros definitivos são os felídeos, pois só neles ocorre o ciclo sexuado do parasita, com a eliminação de oocistos que esporulam no meio ambiente (Kawazoe, 2005).

A primeira descrição do protozoário teve lugar em 1908, em simultâneo por Nicolle & Manceaux (1909), no roedor norte-africano *Ctenodactylus gundi*, e por Splendore (1908) em coelho no Brasil.

2.2.2.2 Ciclo de vida

Os felinos desempenham o papel de HD enquanto praticamente todos os animais homeotérmicos funcionam como HI (Dubey & Lindsay, 2006) (Figura 7). A toxoplasmose é transmitida através de três estádios infecciosos: taquizoítos (individuais ou em grupo), bradizoítos (em quistos nos tecidos) e esporozoítos (nos oocistos) (Dubey & Lindsay, 2006). Os taquizoítos têm normalmente a forma de crescente de lua com 2 a 6 μm . Penetram ativamente nas células do hospedeiro rodeando-se por um vacúolo que os protege das defesas do hospedeiro. No interior das células multiplicam-se por divisão binária até provocarem a rutura da célula infetada. Após um número não determinado de divisões, os taquizoítos de *T. gondii* dão origem a quistos tecidulares, que variam de 5 a 70 μm (Dubey, Lindsay & Speer, 1998). Embora os quistos de *Toxoplasma gondii* possam desenvolver-se nos órgãos viscerais (pulmões, fígado, rins), têm uma maior prevalência na musculatura esquelética e cardíaca e no tecido nervoso, como cérebro, e no olho. Os quistos intactos são inofensivos para o hospedeiro e podem persistir por toda a vida deste (Dubey et al., 1998). A parede dos cistos é elástica e fina (0,5 μm) e pode encapsular centenas de bradizoítos, cada um dos quais medindo entre 1,5 a 7 μm . Os bradizoítos diferem dos taquizoítos por terem o núcleo situado na periferia, ao passo que o núcleo dos taquizoítos tem uma posição mais central. Também são mais delgados e menos susceptíveis à destruição por enzimas proteolíticas (Dubey & Lindsay, 2006).

Quando ingeridos pelos felinos, a parede dos cistos tissulares é digerida pelas enzimas proteolíticas presentes no estômago e intestino delgado (ID), libertando os bradizoítos. Alguns

bradizoítos livres penetram na lâmina própria do ID onde se vão multiplicar em taquizoítos, outros penetram as células epiteliais do ID e multiplicam-se assexuadamente dando origem a esquizontes (Dubey & Frenkel, 1972) (Speer & Dubey, 2005). Os organismos (merozoítos) libertados pelos esquizontes dão origem aos gâmetas masculinos e femininos. Depois da fertilização dos gâmetas femininos por parte dos masculinos, forma-se uma parede celular em volta do gâmeto recém fertilizado (oocisto). Quando o oocisto está maduro, é libertado para o lúmen intestinal pela rutura das células do epitélio intestinal. Com a infeção do gato por *T. gondii*, o parasita persiste no seu organismo pelo menos por vários meses e possivelmente por toda a vida do animal (Dubey & Lindsay, 2006). Os oocistos de *T. gondii* formam-se apenas nos felídeos, tanto domésticos como selvagens. O gato expele os oocistos após a ingestão de taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos (Frenkel, Dubey & Miller, 1970; Dubey & Frenkel, 1972; Dubey, 2006). Menos de 50% dos gatos que ingerem taquizoítos expelem oocistos, mas praticamente todos os gatos que ingerem quistos celulares expelem oocistos nas fezes (Dubey, 2006). Os oocistos encontrados em fezes frescas não estão esporulados, têm a forma esférica com 10 a 12µm de diâmetro. A esporulação ocorre fora do organismo e demora entre 1 a 5 dias, dependendo das condições atmosféricas. Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos, e cada esporocisto contém quatro esporozoítos com 2 a 8µm de tamanho (Dubey & Lindsay, 2006).

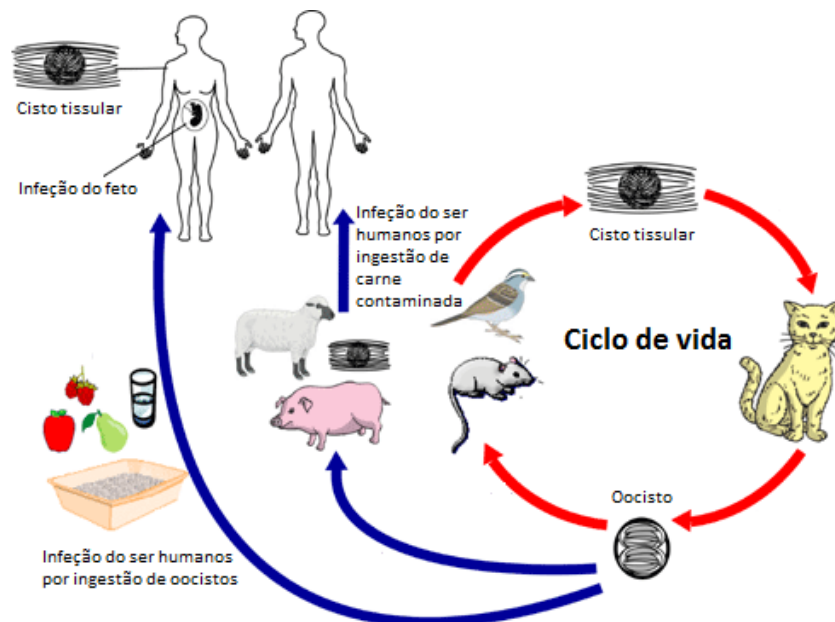


Figura 7: Ciclo de vida de *T. gondii*, adaptado do “Centers for Disease Control and Prevention”: www.cdc.gov

Os hospedeiros, incluindo o gato, podem contaminar-se através da ingestão de tecidos de animais infetados, ou através de comidas e água contaminada com oocistos esporulados ou por transmissão transplacentária. Após a ingestão, os bradizoítos libertam-se dos quistos ou os esporozoítos dos oocistos penetram o tecido intestinal, transformando-se em taquizoítos, multiplicando-se localmente e são disseminados por todo o corpo via sangue e linfa. Após alguns ciclos de multiplicação, os taquizoítos dão origem a grupos de bradizoítos encapsulados em cistos tissulares. As infeções com *T. gondii* durante a gestação podem levar a infeções fetais. A toxoplasmose congénita, em seres humanos, ovelhas e cabras, pode levar a morte fetal (Dubey & Lindsay, 2006).

Após a ingestão de oocistos esporulados, os esporozoítos penetram os enterócitos e células caliciformes do epitélio intestinal, indo para a lâmina própria através de mecanismos ainda desconhecidos. Alguns esporozoítos podem ser encontrados na circulação sanguínea periférica apenas 4 horas depois da infeção. No entanto, a maioria permanece na lâmina própria, podendo multiplicar-se numa variedade de células, incluindo endotélio vascular, fibroblastos, leucócitos segmentados, mas não em eritrócitos (Dubey & Lindsay, 2006).

2.2.2.3 Toxoplasmose em bovinos

Apesar da infeção de bovinos por *T. gondii* estar descrita por diversos autores (Dubey & Jones, 2008; Inpankaew et al., 2010; Wang et al., 2012; Zhou et al., 2012), a infeção natural não parece manifestar sintomatologia clínica, nem abortos, contrariamente a outras espécies (Dubey, 1986). Assim sendo, a infeção de bovinos é principalmente um problema de Saúde Pública, ainda que o papel que estes animais desempenham na transmissão da toxoplasmose ao homem ainda não seja claro (Dubey & Thulliez, 1993; Daguer et al., 2004). Os bovinos parasitados são, teoricamente, uma importante fonte de infeção, dado que a sua carne é uma das mais consumidas a nível mundial e ao hábito de a consumir mal cozinhada ou mesmo crua, principalmente na Europa (Holec-Gąsior, Drapała, Dominiak-Górski & Kur, 2013). Por outro lado, vários estudos demonstraram que muito dificilmente as vacas são infetadas, pois, nestes animais, os quistos de *Toxoplasma gondii* não são muito persistentes (Munday & Corbould, 1979) e poucos quistos são recuperados de vacas naturalmente infetadas (Dubey, 1986).

Mas, embora os bovinos sejam considerados um hospedeiro pouco provável para *T. gondii*, já foram reportadas infeções, tanto naturais como experimentais, em bovinos (Dubey, 2010;

Costa et al., 2011), e estudos indicaram que o consumo de carne de bovinos, crua ou mal cozinhada, são um risco para a infeção por *T. gondii* em seres humanos (Tenter, 2009).

2.2.3 Cisticercose bovina por *Cysticercus bovis*

2.2.3.1 Agente etiológico

A cisticercose bovina (CB) é causada pelos estádios larvares de *Taenia saginata*, *Cysticercus bovis*. Este parasita pertence ao género *Taenia*, da Família Taeniidae. As formas adultas de *Taenia* spp. são encontradas no tubo digestivo de carnívoros e do homem, sendo que cada espécie tem um único HD. *T. saginata* é normalmente encontrada na forma adulta no intestino delgado do Homem (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn & Jennings, 1998). Caracterizam-se por terem um escólex^{com} quatro ventosas e um rostro, não retrátil e armado com duas fileiras de ganchos, à exceção da *T. saginata*, que não tem ganchos. O seu corpo é composto por segmentos (proglotes) retangulares, cada um com um poro genital unilateral (Bowman, 1995). As formas larvares deste género, encontradas nos HI, dependem da espécie em questão e podem ser cisticercos, estrobilocerco e cenuro. Os cisticercos, formas larvares de *T. saginata*, consistem numa única vesícula preenchida por líquido, onde é visível um protoescólex, os estrobilocercos são cisticercos que já se começaram a alongar e a segmentar nos tecidos do hospedeiro intermediário e os cenuros possuem múltiplos protoescólices contidos numa única vesícula, cada um deles com a capacidade de vir a desenvolver um parasita adulto no HD (Bowman, 1995).

2.2.3.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Taenia* spp. (Figura 8) divide-se em duas fases. A primeira é a fase de adulto (ténia) no hospedeiro definitivo (ser humano), em cujo tubo digestivo o parasita produz segmentos (proglótides) contendo um considerável número de ovos, que são expelidos com as fezes do HD. Os ovos de *Taenia* spp. são lançados para o meio ambiente (e.g.: através dos esgotos), onde podem entrar na cadeia alimentar dos hospedeiros intermediários (HI). Conforme a espécie em causa, *T. solium* e *T. saginata*, os HI são respetivamente os suínos e os bovinos.

No HI os embriões de *Taenia* spp., migram através da parede do tubo digestivo para os músculos estriados onde formam pequenas vesículas ou quistos, onde é visível a cabeça (protoscólex) do futuro parasita. Aos estádios larvares de *Taenia solium* e *T. saginata*, dão-se

os nomes de *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus bovis*, respectivamente (Boone et al., 2007; European Commission [EC], 2000).

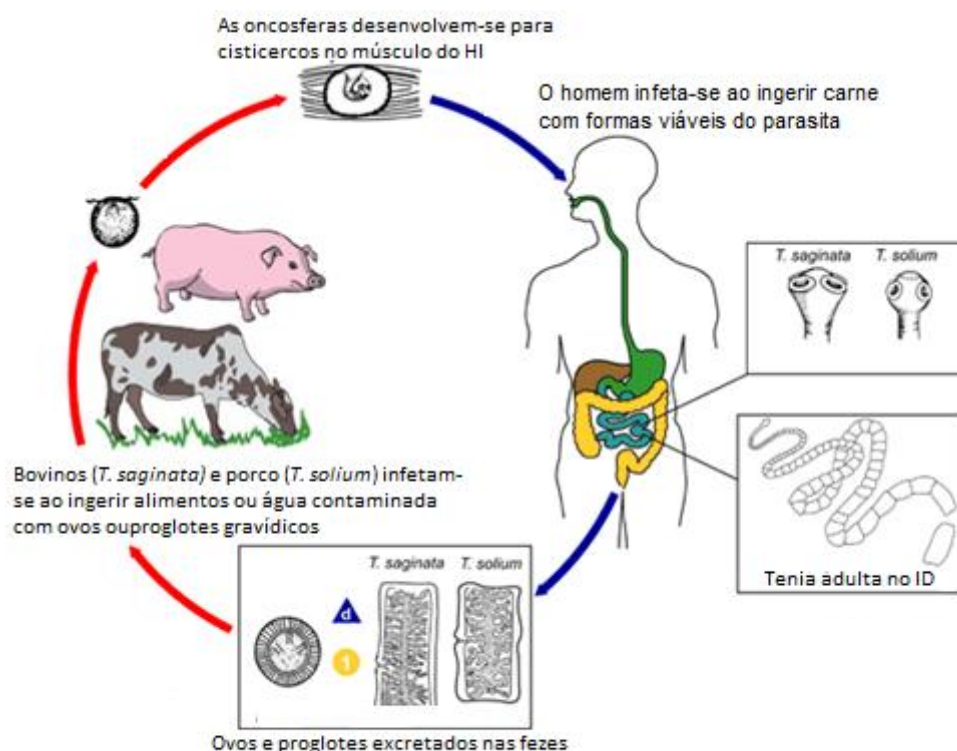


Figura 8: Ciclo de vida da *Taenia saginata* e *T. solium*, adaptado do "Centers for Disease Control and Prevention": www.cdc.gov

A cisticercose bovina, é a alteração do tecido muscular dos bovinos, provocada pela presença de larvas do parasita *T. saginata*. Esta parasitose possui uma distribuição cosmopolita e ocorre tanto em países em desenvolvimento como em países industrializados (Dorny et al., 2000). Por exemplo, na Europa a ocorrência de infeção por *T. saginata* em humanos varia de <0,01% a 10%, e a de *Cysticercus bovis* nos países da UE varia de 0,007 a 6,8% (Cabaret, Geerts, Madeline, Ballandonne & Barbier, 2002).

Se o homem consumir carne crua ou mal cozinhada de bovinos (músculo) contendo cisticercos viáveis, corre o risco de desenvolver parasitas adultos. Um único cisticercos viável pode ser suficiente para o infetar. A prevenção da teniose humana e da CB alcança-se interrompendo o ciclo de vida em vários pontos do mesmo (EC, 2000).

2.2.3.3 **No homem** (*Teniose*)

A forma adulta de *Taenia saginata* mede entre 4 a 10 metros de comprimento, podendo atingir os 25 metros (Soulsby, 1965), tendo em média 2 a 5m de comprimento e 20 a 30g de peso. Tem o corpo nu, achatado dorsoventralmente e é constituído por um grande número de proglotes que lhe confere um aspeto de fita. Possui um escoléx inerme de 1,5 a 2 mm de diâmetro, com 4 ventosas que são os seus órgãos de fixação (não possui rostro nem ganchos), e um pescoço, onde se formam novos proglotes, seguido do estróbilo com 1000 a 2000 proglotes (Soulsby, 1965; Olsen, 1979).

O homem contrai teniose ingerindo carne de bovinos com cisticercos viáveis. No tubo digestivo, por ação dos sais biliares, o protoescoléx evagina e fixa-se à mucosa do intestino delgado ao nível do jejuno. Decorridos 3 a 4 meses, o parasita atinge o estado adulto (sexualmente maduro), expelindo proglotes com as fezes (Olsen, 1979).

Diagnóstico

A teniose é regra geral assintomática, sendo, muitas vezes o diagnóstico realizado a partir do aparecimento de proglotes móveis, expulsos nas fezes, ou que, de forma espontânea, forçam o esfíncter anal (Bowman, 1995). Cerca de dois a três meses após a infeção, os proglotes grávidos destacam-se da extremidade distal do parasita, contendo cada segmento cerca de 80 000 ovos (Bowman, 1995).

A World Health Organisation (WHO) em 1993, citada por Vinueza, Gallegos, Barrionuevo, Celi & Benitez, (2001) e Afonso (2008), menciona os seguintes métodos coprológicos para a deteção de ovos de *Taenia* spp.:

a) *Esfregação fecal direto* – preparação a fresco da amostra com soro salino e solução iodada. É simples e de baixo custo, pelo que é muito utilizado, mas a sua sensibilidade é muito baixa (40 a 44,4%);

b) *Esfregação fecal grosso em celofane de calibre standardizado (técnica de Kato-Katz)* – alguns investigadores obtiveram melhores resultados no diagnóstico de tenioses do que com o exame direto;

c) *Métodos coprológicos de concentração:*

- *Flutuação* – é de pouca sensibilidade na deteção de ovos de cestodes;

- *Centrifugação e flutuação* – quando utilizado de forma seriada, pode oferecer bons resultados;

- *Sedimentação* – embora útil na deteção de ovos densos, a sua sensibilidade é inferior a 60%.

d) *Técnica de esfregaço perianal* – efetua-se, com a ajuda de fita adesiva transparente, um esfregaço da região anal e perianal, o que permite recolher ovos ou proglotes de *Taenia* spp. (eficácia de 80 a 88,9%);

e) *Técnica de Ritchie ou técnica de concentração por sedimentação com formol éter*, Ritchie, (1948) – é usada para concentrar ovos e larvas de helmintes, assim como quistos de protozoários presentes nas fezes, especialmente quando não se obtiveram bons resultados devidos ao excesso de gorduras e ácidos gordos. Hall e os seus colaboradores (1981), descrevem uma eficácia, na deteção de ovos de *T. saginata*, de apenas 68%;

f) *Coproantígenios* – baseia-se na deteção de antígenios específicos de *Taenia* spp. nas fezes, utilizando o método ELISA. Esta técnica tem obtido bons resultados, mesmo na fase inicial da infeção, com uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 94%;

g) *Reação em cadeia da polimerase* (Polymerase Chain Reaction - PCR) – A metodologia baseada no HDP2-PCR pode ter uma sensibilidade e especificidade de 100%, especialmente para identificar seres humanos portadores desta parasitose. Além da sua importância clínica, é adequada a sua utilização em estudos epidemiológicos para monitorização da contaminação ambiental ou identificação de áreas endémicas, tendo em vista a tomada de decisões, a nível de Saúde Pública, com o fim de evitar danos económicos na indústria da carne (Nunes et al., 2003).

Tratamento

São conhecidos relatos de tratamentos para a teniose desde a Antiguidade, como por exemplo o chá de sementes de abóbora. Nos dias de hoje, segundo a WHO, os princípios ativos utilizados no combate a esta parasitose são, a niclosamida (desde 1960) e o praziquantel (desde 1972) (Pawlowski, 2005). Como alternativa pode utilizar-se mebendazol ou paramomicina. Contudo, estas substâncias ativas matam o verme, mas não afetam os ovos presentes no lúmen do intestino. O tratamento fará com que a ténia se desintegre, libertando milhares de ovos viáveis. Assim, as fezes das pessoas em tratamento deverão ser

descartadas adequadamente por um período de pelo menos 48 horas para evitar o completar do ciclo (European Food Safety Authority [EFSA], 2004).

2.2.3.4 **Nos bovinos** (*Cisticercose*)

Os bovinos, HI no ciclo de vida da *Taenia saginata*, contaminam-se através da ingestão de ovos viáveis do parasita. Após serem ingeridos, os ovos eclodem, libertando oncosferas que por sua vez penetram na mucosa intestinal, migrando através da corrente sanguínea e/ou linfática para formar cisticercos em diferentes partes do corpo: rins, língua, fígado, pulmões, diafragma e músculos estriados esqueléticos e cardíacos. Num ensaio levado a cabo por Minozzo, Gusso, Castro, Lago & Soccol, (2002), onde novilhos foram deliberadamente infetados com ovos de *T. saginata*, a taxa de recolha de cisticercos foi de 14.8% nos diversos órgãos (coração, diafragma, pulmões, rins, fígado e língua), mas a grande maioria (85.2%) encontrava-se na musculatura esquelética.

Infeção dos bovinos

A infeção do gado bovino pode ocorrer por via direta ou indireta, por contaminação de pastagens, alimento e água entre outros (EFSA, 2004). A deteção de ovos de *T. saginata* viáveis no meio ambiente, chorume, palha, feno, outros alimentos e na fonte de abastecimento de água poderá ser útil para determinar a origem de um surto (Kyvsgaard, Ilsoe, Willeberg, Nansen & Henriksen, 1991a; Lees, Nightingale, Brown, Scandratt & Gajadhar, 2002). Cabaret et al., (2002) reviu os métodos tradicionais de recuperação de ovos de helmintes em águas residuais e lamas, demonstrando que a maioria dos métodos tinha baixa taxa de recuperação para ovos de *Taenia* spp. (19-48%), sendo o método de tripla flutuação o que permite melhores resultados.

Os ovos de *T. saginata* podem manter-se viáveis no solo aproximadamente 7 a 8 meses (Jepsen & Roth, 1949; Ilsoe, Kyvsgaard, Nansen & Henriksen, 1990). Jepsen & Roth (1949) demonstraram que os ovos de *T. saginata* continuavam infetantes para vitelos após passarem 33 dias a 18°C. Hadjuk (1969) reportou a sobrevivência de ovos de *T. saginata* em água corrente após 35 dias. Já no esgoto, os ovos têm uma sobrevivência de 16-20 dias a 18°C (Jepsen & Roth, 1949; Hajduk et al., 1969).

Apesar de alguns estudos mais antigos demonstrarem que mais de metade dos ovos presentes nas lamas de esgotos permanecem infetantes por mais de 6 meses, se mantidos num intervalo de temperatura de 24-30°C, sabe-se que estes podem ser facilmente mortos através de tratamentos como a digestão anaeróbia, calagem ou lagunagem por um período

de 24 dias (Pike, 1986), ou digestão aeróbica a 50°C por 6 dias (Morris, Hughes, Hewitt & Norrington, 1986).

No meio ambiente podem sobreviver até 6 meses em condições de temperatura baixa e humidade elevada, embora, com temperaturas elevadas e em zonas secas resistam menos de 2 meses. Na pastagem podem permanecer por mais de 180 dias (Hajduk *et al.*, 1969), 22 dias no feno com temperaturas superiores a 30°C (Lucker & Douvres, 1960) e 80 dias em silagem a 10°C (Enigk, Stoye & Zimmer, 1969).

Dose-resposta em vitelos

Aquando da expulsão nas fezes humanas, as oncosferas, contidas nos ovos dentro dos proglotes, já se encontram maduras e no estado infetante. Quando atingem o interior do tubo digestivo dos vitelos, fatores como a presença de sais biliares, vão desencadear a sua libertação e conseqüente ativação. No prazo de 2 horas, elas atravessam a parede do tubo digestivo, penetram nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos, indo migrar, preferencialmente para os músculos, onde enquistam e tornam-se metacestodes. O escolex pode ser identificado 30 dias após enquistarem-se e as ventosas distinguem-se entre o quadragésimo e o quinquagésimo dia. O metacestode atinge o seu tamanho máximo ente os 60 e 70 dias. Por cada ovo ingerido por um bovino, há uma forte probabilidade de este formar um cisticercos. No entanto, segundo Jepsen & Roth (1949), há uma dose mínima para que um animal fique infetado. Estes autores descobriram que em vitelos infetados com 30 e 100 ovos desenvolveram-se 3 e 8 cisticercos respetivamente e com 500 ovos produziram 60 a 80 cisticercos.

Taxa de sobrevivência dos cisticercos nos músculos

De uma forma geral demora entre 60 a 70 dias, desde a ingestão até que os metacestodes estejam completamente desenvolvidos, podendo ser detetados macroscopicamente entre um a dois meses pós-infeção. O tempo de sobrevivência dos cisticercos é de alguns anos, começando depois a degenerar, desenvolvendo-se um processo necrótico no local onde se encontram, acabando por calcificar ou formar um granuloma. Contudo, nalguns órgãos (e.g.: fígado, pulmão e coração) os cisticercos podem degenerar tão cedo como 20 dias pós infeção. É comum encontrar cisticercos vivos e mortos no mesmo animal (Gemmell, Matyas, Pawlowski & Soulsby, 1983).

Os vitelos podem diferenciar-se dos animais adultos pelo tempo de sobrevivência dos cisticercos nos músculos, que pode variar entre 21 e 30 meses, mas a infeção neonatal pode

resultar em sobrevivência prolongada do cisticerco, que pode durar até à morte do hospedeiro (Gemmell *et al.*, 1983).

Fatores de risco para os bovinos

A forma mais direta de infetar bovinos com *Cysticercus bovis* é a deposição de excrementos de humanos parasitados na área da exploração, na pastagem, currais e nos alimentos para o gado. De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, 2004) os principais fatores de risco para os bovinos em relação à infeção por ovos de *T. saginata* são:

Fonte de água:

O gado bovino pode ingerir ovos de *T. saginata* através da água. A água proveniente de fontes como rios, lagos e lagoas, onde são efetuadas descargas de esgotos não tratados, aumenta significativamente o risco de contaminação. Nas áreas geográficas expostas a inundações, mesmo para explorações onde o abastecimento de água é controlado, pode dar-se a contaminação dos reservatórios devido a essas inundações.

Desperdícios orgânicos como meio de fertilização dos solos:

As lamas dos esgotos contêm frequentemente ovos de *T. saginata*, mas a determinação da prevalência numa dada área é difícil de efetuar (Cabaret *et al.*, 2002). Contudo o uso de lamas como fertilizante está diretamente relacionado com infeções nos bovinos, como já foi comprovado para zonas onde há um elevado registo de cisticercose (Engelbrecht & Mentzel, 1984). O estrume, proveniente das explorações agropecuárias não contém, por si só, ovos de *T. saginata*, mas pode haver contaminação daquele a partir excrementos de humanos infetados (EFSA, 2004).

Tipos de forragem:

Forragens como o feno, silagem, subprodutos de colheitas (e.g. derivados da batata), originários de locais contaminados com dejetos humanos, podem ser a fonte de cisticercose bovina. As forragens, para além de se poderem contaminar antes da colheita, podem também contaminar-se no local de armazenamento e/ou na distribuição aos animais.

Localização da exploração:

Como os proglotes de *T. saginata* só podem ser excretados pelos humanos, as explorações bovinas localizadas perto de zonas densamente povoadas ou de passagem (caminhos de

ferro, caminhos rurais) podem ter, direta ou indiretamente, uma exposição mais elevada ao agente infetante.

Sistemas de exploração:

É difícil de avaliar qual o sistema (extensivo ou intensivo) mais suscetível a contaminações, mas pode-se dizer que um regime extensivo é menos controlável, porque pessoas estranhas à exploração podem ter acesso às zonas de pastoreio e depósitos de água, ao passo que numa exploração intensiva o acesso é mais restrito. Por outro lado a concentração de animais nos sistemas intensivos, faz aumentar a exposição destes a uma hipotética infeção.

Formação dos operadores:

Os funcionários de uma empresa agropecuária que recebem formação em saúde pública, incluindo a sensibilização para o ciclo de vida do parasita, apresentam um menor risco como fonte de contaminação do meio ambiente.

Idade dos animais:

Assume-se que a probabilidade de um animal se infetar com cisticercos aumenta com a idade. Isto porque, a alimentação dos animais mais velhos é efetuada com base em forragens e, quanto mais idade têm, maior a potencial exposição ao agente.

Monitorização e vigilância de surtos:

É normal que quando há informação fidedigna sobre a real prevalência/distribuição de cisticercose bovina, onde o sistema de vigilância e monitorização funciona, é mais fácil a implementação de medidas de controlo. A falta desta informação aumenta o risco epidemiológico.

Avaliação de risco associada aos diferentes métodos de produção

Para que se possa fazer um estudo de risco de CB em bovinos criados em diferentes sistemas de produção, são necessários dados fiáveis sobre:

1. Prevalência do agente patogénico nos bovinos, população humana e ambiente;
2. Parâmetros quantitativos da sobrevivência e infecciosidade dos ovos de *T. saginata* em diferentes substratos e sob diferentes condições físico-químicas;
3. Os efeitos da variação regional e sazonal nos fatores dos pontos anteriores;

Contudo, a maioria desses dados não estão disponíveis ou, são insuficientes. E como os fatores de risco podem estar associados entre si numa grande variedade de combinações, mesmo em sistemas de produção idênticos, o Plano de Riscos Biológicos da EFSA (BIOHAZ Panel) conclui que um método quantitativo aplicável a todos os diferentes sistemas de produção é atualmente impraticável (EFSA, 2004). No entanto, foi efetuada uma tentativa para desenvolver um quadro geral de avaliação de risco para a infeção por *Cysticercus bovis* em relação aos diferentes sistemas de produção de bovinos.

A abordagem utilizada foi baseada na adaptação dos princípios usados na determinação de perfis de risco microbiológico dos alimentos (Campden & Chorleywood Food Research Association [CCFRA], 2000). Em primeiro lugar, cada fator de risco é avaliado em relação aos diferentes cenários, sendo-lhes atribuídos diferentes níveis de risco de uma escala pré-definida. Em segundo lugar, para cada sistema de produção, a soma total das pontuações dadas pelos fatores de risco pode determinar o perfil de risco do sistema em relação à infeção de animais por ovos de *T. saginata* (EFSA, 2004).

Recomendações à inspeção sanitária de acordo com os perfis de risco

No que diz respeito à inspeção *post-mortem* de novilhos para pesquisa de cisticercos de *T. saginata*, o Scientific Panel on Biological Hazards (SPBH) acredita que diferentes abordagens podem ser usadas para novilhos provenientes de diferentes sistemas de produção consoante o perfil de risco.

O risco de saúde pública, decorrente da não deteção nos cortes na inspeção sanitária (IS) de carcaças pode ser considerado negligenciável em novilhos vindos de explorações com baixo risco. Nesses bezerros, de menor risco, a inspeção *post-mortem* detalhada para cisticercose, incluindo o corte do tecido muscular, pode não ser necessária, recorrendo-se somente à inspeção visual, evitando o manuseamento excessivo das carcaças, fator de risco para contaminações microbianas. Nos países onde a CB é reduzida, o procedimento de inspeção tem um impacto negligenciável na redução do nível de risco de saúde pública (EFSA, 2004). Para animais provenientes de explorações com perfil de risco médio, a não deteção de cisticercos na IS aumenta o risco de infeção humana em relação às explorações de baixa prevalência, mas mesmo assim esse risco pode ser considerado negligenciável. Para esses animais, pode efetuar-se a inspeção de rotina, se combinada com um teste de lotes validado (como um teste serológico) de um número representativo de animais antes do abate (EFSA, 2004).

Em países de elevada prevalência, as falhas na inspeção *post-mortem* de rotina são inaceitáveis em relação aos riscos de Saúde Pública. Desta forma, a inspeção de rotina

(palpação e cortes), devem ser complementados com testes de deteção de antigénio altamente sensíveis (EFSA, 2004).

Diagnóstico

Os métodos empregues por rotina na inspeção sanitária de carcaças em matadouros, tais como a visualização, palpação e incisão dos músculos, não são os métodos mais eficazes na deteção de cisticercos de *T. saginata*. Isto porque, a inspeção de carcaças é realizada rotineiramente em áreas classificadas como “sítios de eleição” para os cisticercos, como o coração, músculos mastigadores, língua, diafragma, apesar de em muitos casos os bovinos infetados apresentarem aquelas formas larvares em partes do corpo não sujeitas a uma inspeção tão rigorosa (Minozzo et al., 2002; Wanzala, Onyango-Abuji, Kangethe, Ochanda & Harrison, 2002; Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health [SCVPH], 2000; SCVPH 2003). Essas áreas são inspecionadas somente quando se encontram infeções maciças (Queiroz, Santos, Barbosa, Souza & Filho, 2000). Por isso a superfície exposta pelas incisões na inspeção é limitada e estimada em 2000-2500 cm² para os masséters, 250 cm² para o coração, sendo que a incisão dos masséteres revela apenas 40% dos quistos e a inspeção do coração apenas 10% (Biering-Sorensen, 1977). Num estudo levado a cabo por Geerts, Kumar & van den Abbeele (1980), foram detetados um ou mais cisticercos em 25 corações de um grupo de 100 previamente sujeitos a inspeção e aprovados para consumo humano. Kyvsgaard, Ilsoe, Henriksen & Nansen, (1990) calcularam a probabilidade de encontrar pelo menos um cisticercos pelo método standard de IS com a fórmula $P = 1 - 0,96^n$ sendo (n) o número de cisticercos presentes.

Outros fatores importantes para a deteção de cisticercos de *T. saginata* na IS são a experiência e/ou motivação do inspetor, a velocidade da linha de abate e a adequação das infra estruturas de trabalho dos inspetores (EFSA, 2004). Walther & Koske, (1980) consideraram que em animais naturalmente infetados o número de larvas por animal não ultrapassa as quatro. Usando a fórmula calculada por Kyvsgaard et al., (1990) conclui-se que a probabilidade da deteção de 1, 2, 3, 4 e 5 cisticercos, na IS tradicional é de respetivamente 4, 8, 12, 15 e 18%.

Assim, é exetável que a verdadeira prevalência seja de três a dez vezes superior à que é detetada pela inspeção sanitária nos matadouros (Geerts, Kumar, Ceulemans & Mortelmans, 1981; van Knapen & Buys 1985; Onyango-Abuge et al., 1996; Dorny et al., 2000).

Num estudo levado a cabo na Bélgica por Dorny et al., (2000), através de inspeção sanitária de rotina, foram detetadas 0,26% das carcaças com cisticercos de *Taenia saginata* e, no mesmo grupo de animais, utilizando um teste de Ag-ELISA, esse valor subiu para 3,09%. A

disparidade de resultados observada sugere que a IS através da palpação e incisão pode apenas identificar uma fração das carcaças efetivamente parasitadas. Esta conclusão é suportada pelos resultados de estudos conduzidos na Dinamarca, demonstrando que a inspeção rotineira não é suficientemente sensível para detetar infeções ligeiras, encontradas predominantemente no gado dinamarquês (Kyvsgaard, Ilsoe, Henriksen, Feld & Nansen, 1991b). Outros estudos têm vindo a demonstrar que cerca de 49 a 51% dos animais com infeções ligeiras não apresentam cisticercos nos locais inspecionados por rotina (McCool, 1979; Walther & Koske, 1980).

A aplicação de métodos alternativos de diagnóstico é imprescindível para o aperfeiçoamento das ações de inspeção nos matadouros e de estudos epidemiológicos (Minozzo, Soccol, Olortegui, Soares & Costa, 2004; Girotto, Pinto, Dias, Chaves &erreira 2009).

A resposta imunitária dos HI aos parasitas do género *Taenia* é mediada por anticorpos (Ac) (Harrison & Parkhouse 1989; Ferrer et al., 2003; Harrison et al., 2005). Como consequência a aplicação de testes imunológicos é viável para a identificação de animais que tenham entrado em contato com o agente parasitário.

Se, se optar por testes imunológicos para a deteção de *Cysticercus bovis* em IS, deve-se preferir testes para deteção de antigénio em detrimento de testes de pesquisa de anticorpo, isto porque, a deteção de anticorpo anti-*Cysticercus bovis* não nos dá a capacidade de distinguir uma infeção recente de uma antiga já resolvida. De igual modo, pode-se encontrar anticorpos anti-*Cysticercus bovis* em vitelos devidos à transmissão no colostro materno, dando origem a falsos positivos. Os testes de deteção de antigénio podem ser utilizados para vigilância epidemiológica de grandes efectivos (Harrison, Joshua, Wright & Parkhouse, 1989; Brandt et al., 1992).

2.3 Cisticercose bovina na Região Autónoma da Madeira

A RAM, pelas suas características geoclimáticas, intimismo homem-animal, grande número de pequenas explorações de gado bovino, grande apetência para o consumo de carne destes animais e deficiente situação socio-económico-cultural das populações, tem todas as condições para ser uma área de eleição para o desenvolvimento de cisticercose bovina (Santos, Bastos & Almeida, 1991).

Os registos mais antigos da existência de *Taenia saginata* na região datam da década de 1950, em diversos trabalhos efetuados por Maia (1949, 1950, 1952 e 1953).

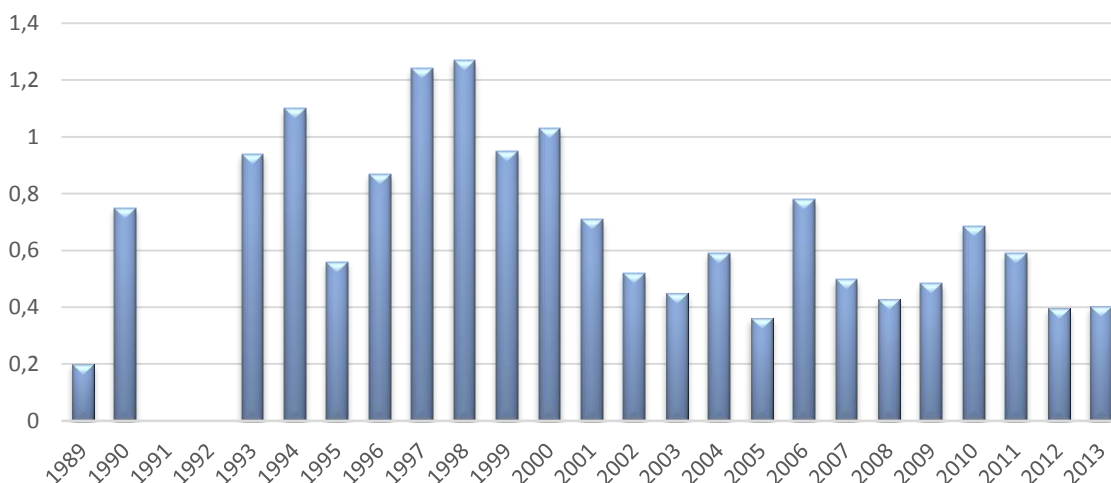
Mais recentemente, Teixeira et al., (1984), citados por Afonso (2008) observaram a existência de teniose, sem no entanto procederem à conveniente identificação dos helmintas envolvidos,

em 22 de 478 crianças com idade compreendida entre 1 e 10 anos, dos diversos concelhos da Ilha da Madeira.

Com o alargamento da inspeção sanitária realizada por Médico Veterinário a toda a ilha, conseguido a partir de 1984, e o incremento das reprovações nos matadouros regionais por cisticercose bovina, tornou-se clara a importância económica e sanitária deste parasita (Santos et al., 1991).

Santos et al., (1991) referiram que, de acordo com Bacili Dionísio, inspetor sanitário na RAM durante 45 anos, antes de 1987 não haviam sido detetados casos de CB nos concelhos onde havia inspeção sanitária efetuada por Médico Veterinário. No entanto, a partir de 1988 e até à data, foram rejeitadas recorrentemente, parcial e/ou totalmente, carcaças de bovinos infetadas com cisticercose bovina (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Percentagem de reprovações totais (RT%) de carcaças por cisticercose bovina na RAM



Os principais fatores apontados para a prevalência desta parasitose na RAM são: o regime de criação dos animais, a estabulação fixa, regra geral, em locais de difícil acesso pedonal, onde o sistema de saneamento básico é muito precário, o que leva à não existência de instalações sanitárias para os proprietários e à não utilização de água potável para o abeberamento dos animais, como também a utilização de forragens colhidas em zonas de carácter sanitário duvidoso (Afonso, 2008).

A grande maioria dos bovinos abatidos na ilha da Madeira tem origem externa à região, sendo o principal fornecedor a Região Autónoma dos Açores (RAA), havendo em muito menor número animais provenientes de Portugal Continental, e de outros países da União Europeia, como a Holanda, Alemanha e França (Afonso, 2008).

A importação dos animais é efetuada por explorações de média/grande dimensão, que os colocam em *feedlots* onde é realizado o “acabamento” até serem encaminhados para abate. São vendidos também alguns animais a pequenas explorações. Essas pequenas explorações albergam 1 a 5 bovinos, sendo poucas as que recebem mais animais, destinados em muitos casos ao autoconsumo. Os animais nascidos na Região Autónoma da Madeira usualmente são pertença dessas pequenas explorações (Afonso, 2008).

A deteção de casos de cisticercose em animais nascidos na ilha, juntamente com a identificação de casos de teniose por *Taenia saginata* em diversos centros de saúde da ilha (Afonso, 2008) prova que o ciclo de vida do parasita completa-se na região.

Como a maioria do gado abatido e consumido na RAM tem proveniência exterior à região, sendo a maioria adquirida nos Açores, torna-se difícil determinar a origem da infeção a quando da deteção em IS. Segundo Santos et al., (1991) citando Gracey (1986), que considera o período de 18 semanas o necessário para o completo desenvolvimento dos cisticercos na musculatura dos bovinos, embora, em certos casos, a partir das 6 semanas já seja possível o seu diagnóstico. Os animais infetados provenientes da RAA, com permanência na RAM inferior a 18 semanas, são considerados infetados na origem. O mesmo critério para a determinação da origem da infeção foi utilizado por Fonseca & Spínola (2000) e Afonso (2008). Tendo, os diversos investigadores, referido 5 animais em 1990 (Santos et al., 1991), 161 entre 1999 e o primeiro semestre de 2000 (Fonseca & Spínola, 2000) e 98 animais entre 2005 e 2006 (Afonso, 2008), oriundos da RAA, com permanência inferior a 18 semanas na RAM, os quais foram totalmente reprovados, pelos inspetores sanitários dos matadouros locais.

Dadas as semelhanças entre características geoclimáticas, intimismo homem-animal e situação socio-cultural das duas regiões, bem como o elevado número de animais identificados com cisticercose provenientes de todas as ilhas do Arquipélago dos Açores, torna-se evidente que a RAA tem um papel preponderante na introdução de novas fontes de infeção na RAM (Santos et al., 1991; Fonseca & Spínola, 2000; Afonso, 2008). Contudo, a inexistência de casos confirmados de *Cysticercus bovis* nos diversos matadouros da RAA, bem como de casos comprovados da presença de *Taenia saginata* na região, tornou este, um dos pontos mais controversos entre as autoridades de Inspeção Sanitária das duas Regiões Autónomas.

2.4 Produção de carne de bovino nos Açores

Características geoclimáticas

Localizado em plena bacia do Atlântico Norte, a norte da influência predominante dos ventos Alísios e em pleno cinturão subtropical de células de altas pressões, o arquipélago dos Açores situa-se numa zona de transição e de confrontação de massas de ar de proveniência tropical e massas de ar mais frio de origem polar (Azevedo, 2001). Assim, o clima do Arquipélago é essencialmente ditado pela localização geográfica das suas ilhas no contexto da circulação global atmosférica e oceânica e pela influência da massa aquática da qual emergem (Azevedo, 2001).

O clima das ilhas apresenta uma sazonalidade medianamente marcada que se reflete nos diferentes elementos do clima. As quatro estações do ano, típicas dos climas temperados, são reconhecíveis. As amplitudes térmicas são baixas pelo que nem as temperaturas de verão nem as de inverno se manifestam excessivamente rigorosas. Episódios de precipitação intensa e localizada são frequentes, particularmente nos períodos de inverno, com graves implicações nos regimes de escoamento (Azevedo, 2001).

Efetivo bovino

De acordo com o recenseamento agrícola de 2009, realizado pelo Instituto Nacional de Estatística (INE), o efetivo bovino da Região Autónoma dos Açores contava em 2009 com 248763 animais, 43,5% na Ilha de S. Miguel, 23,6% na Ilha da Terceira, 10,4% no Pico e os restantes 22,5% divididos pelas restantes ilhas do arquipélago.

A produção leiteira é a principal atividade económica do arquipélago, tornando as vacas leiteiras, predominantemente a raça Holstein Frisia, o grupo mais numeroso, com 92381 vacas leiteiras na região, sendo a Ilha de S. Miguel, com 59% do efetivo leiteiro da RAA, a maior produtora de leite, seguida pela Ilha Terceira, com 26%, pela Ilha de S. Jorge (7%) e do restante das ilhas (8%).

Em relação à produção de bovinos para carne, há duas principais vertentes na RAA, a utilização de raças de carne, como a Limousin, a Charolesa, a Hereford e mais recentemente a Angus, ou o aproveitamento de vitelos, Holstein Frisia e cruzamentos desta raça com raças de carne, nascidos nas explorações leiteiras. A ilha com maior vertente para a produção de raças de carne puras é a Ilha do Pico, que contava em 2009 com 3664 vitelos de engorda

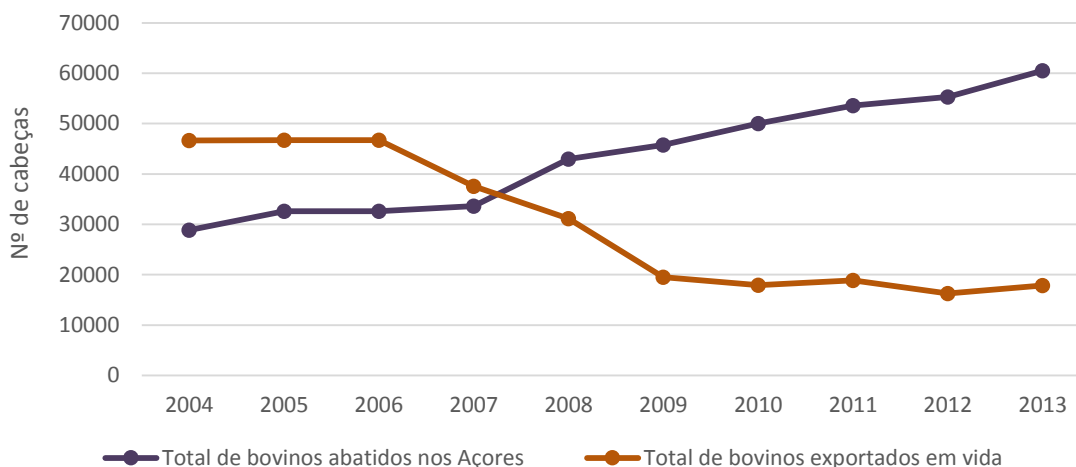
(com menos de 1 ano de idade) e 7510 vacas aleitantes, respetivamente 44% e 30% dos vitelos de raças de carne e das vacas aleitantes da RAA, seguida pela Ilha da Terceira, com 18,5% dos vitelos de raças de carne e 8% das vacas aleitantes e pela Ilha de S. Jorge, com 16% dos vitelos de raças de carne e 15,5% das vacas aleitantes. Relativamente ao aproveitamento de bovinos nascidos nas explorações leiteiras, as ilhas de S. Miguel e da Terceira são as que fornecem mais animais, estando contabilizados, no mesmo censo, 3917 novilhos entre 1 e 2 anos em engorda para abater na Ilha de S. Miguel e 4622 da mesma faixa etária na Ilha da Terceira.

Evolução na produção de carne de bovinos nos Açores

A produção de carne nos Açores surgiu como um aproveitamento dos vitelos excedentes das explorações leiteiras da região. Os vitelos nascidos nas explorações leiteiras eram, na sua maioria, abatidos e incinerados poucos dias após o nascimento, vendidos a explorações de engorda intensiva, onde os vitelos permaneciam estabulados durante as fases de cria e recria e exportados em vida para Portugal continental, onde era realizado o acabamento e abate desses animais. Outra importante fileira de comercialização de animais vivos, com o objetivo da produção de carne, era constituída por novilhas e vacas de primeira lactação destinadas à Região Autónoma da Madeira. O abastecimento local era feito essencialmente por vacas de refugo das explorações leiteiras e por novilhos, maioritariamente de raças leiteiras (Holstein Frisia) ou cruzamentos destas com raças de aptidão carne, nascidos e engordados nestas explorações (Sousa & Fragata, 2004).

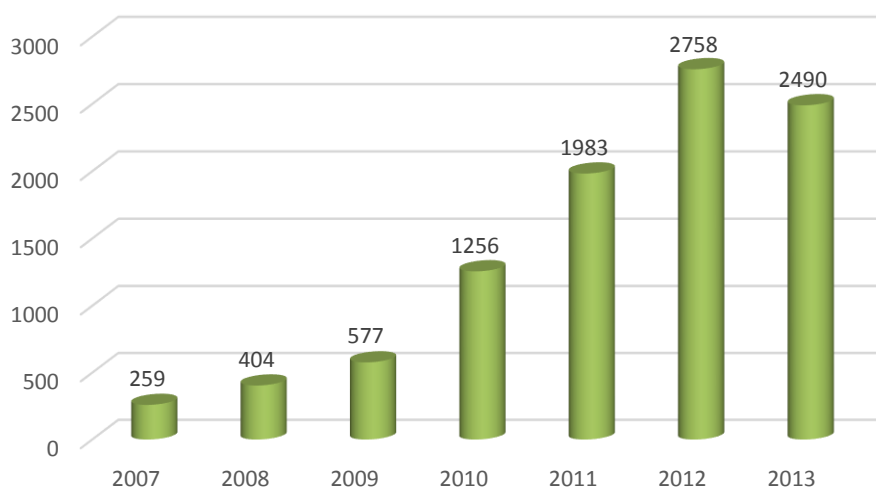
Nos últimos anos, a produção de carne na RAA teve um aumento considerável, ao passo que a saída de animais vivos tem vindo a decrescer consideravelmente (Gráfico 3).

O aumento, para mais do dobro em pouco mais de 10 anos, dos abates efetuados na RAA teve a exportação como o seu principal objetivo. Em 2013, foram abatidas na região 60479 cabeças de gado, dos quais 37453 foram para exportação, perfazendo um total de 7861261 Kg de “carne de vaca” saídos do arquipélago nesse ano (<http://estatistica.azores.gov.pt/>).

Gráfico 3 – Relação entre bovinos abatidos e saída de bovinos vivos da RAA entre 2004 e 2013

Esta mudança no sector da carne de bovinos no Arquipélago dos Açores, deveu-se ao surgimento de novas explorações dedicadas à produção de bovinos de carne. Segundo o INE, o número de explorações que tinham vitelos de raças de carne cresceu de 460 em 1999 para 946 em 2009, devido à importação de raças de carne exóticas, ao surgimento de associações de produtores de carne de bovinos no arquipélago, mas principalmente devido à inscrição, em 2003, no registo europeu das denominações de origem e indicações geográficas da *Carne dos Açores* – Indicação Geográfica Protegida (IGP), o que impulsionou o comércio da carne da RAA na última década.

Segundo o Regulamento (CE) Nº 617/2003, de 4 de Abril, designa-se como *Carne dos Açores* – IGP, a obtida de bovinos nascidos, criados e abatidos na Região Autónoma dos Açores, com características da carne segundo a classe etária e os moldes tradicionais de produção. A certificação de carcaças, como *Carne dos Açores*, tem vindo a aumentar significativamente ao longo dos anos (Gráfico 4), revelando a maior apetência do consumidor nacional pela carne produzida na região.

Gráfico 4 - Evolução do nº de carcaças certificadas na RAA

Matadouros da Região Autónoma dos Açores

Tanto a obrigatoriedade dos animais serem abatidos na região, para poderem ser designados como produzidos segundo os requisitos *Carne dos Açores* – IGP, bem como o aumento da exportação de carne de bovinos, não produzidos neste regime, mas que beneficiaram da “marca Açores”, obrigou ao melhoramento e construção de novas infraestruturas destinadas ao abate e desmancha de bovinos, levando a que todas as nove ilhas do arquipélago estejam equipadas com infraestruturas próprias ao abate de bovinos, havendo na região 8 matadouros e uma casa de matança, na ilha do Corvo. Compete ao Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas (IAMA), a tutela e a gestão da rede regional de abate (www.azores.gov.pt).

Os maiores matadouros da RAA são os da Ilha de São Miguel e da Ilha Terceira, tendo sido abatidos respetivamente 24564 e 21874 cabeças no ano de 2013, 76,8% do total da região. Sendo que, o matadouro que abateu mais animais para exportação foi o da Ilha Terceira, 16 746 em 2013, aproximadamente 45% das exportações de carne da RAA, seguido do de São Miguel com 12 408 (33%) e o da Ilha do Pico com 5658 (15%).

Cisticercose na Região Autónoma dos Açores

Devido à obrigatoriedade do abate em matadouro de todos os bovinos destinados ao consumo humano, com a exceção de animais destinados ao autoconsumo, de acordo com o Despacho n.º 14535-A/2013, e da atuação do médico veterinário oficial na inspeção sanitária em matadouro, conforme o Regulamento (CE) Nº 854/2004, de 29 de Abril, todas as carcaças são rigorosamente inspecionadas antes de entrarem na cadeia alimentar.

Juntando a essa realidade, a sensibilização dos médicos veterinários oficiais da região face à problemática existente na RAM, com bovinos infetados com cisticercose, provenientes da RAA, as características geoclimáticas, a apetência para a produção e consumo de carne de bovinos e a intimidade bovinos-homem, que se verifica na RAA, era de esperar que fossem detetados casos de cisticercose bovina nos Açores. Mas, até à data não foi descrito nenhum caso de cisticercose em bovinos abatidos nos matadouros da Região.

CAPITULO III – PARASITISMO MUSCULAR POR *Sarcocystis* spp. E *Taenia saginata* EM BOVINOS NA REGIÃO AUTÓNOMA DOS AÇORES: Estudos de caso

3.1 Objetivos

As principais parasitoses com características zoonóticas encontradas na carne de bovinos são a sarcocistiose e a cisticercose bovina. A presente dissertação de Mestrado pretende contribuir para o estudo destes parasitas e respectivas parasitoses na Região Autónoma dos Açores.

Desta forma o trabalho experimental foi dividido em duas áreas de estudo: i) uma referente à pesquisa da presença de espécies do género *Sarcocystis* em bovinos abatidos no Matadouro Industrial da Terceira (ESTUDO 1); ii) e a outra relativa à determinação da infeção por *Cysticercus bovis* nos Açores através da identificação de casos de cisticercose detetados por Inspeção Sanitária na Região Autónoma da Madeira (RAM) em animais provenientes dos Açores e que tenham permanecido na RAM por um período de tempo inferior ao necessário para que a identificação macroscópica dos cisticercos seja possível (6 semanas) (ESTUDO 2); e através da pesquisa da concentração de anticorpos anti- *Cysticercus bovis*, em bovinos nascidos na Ilha Terceira e abatidos na RAM antes do embarque, comparando as concentrações do Ac com a decisão sanitária (ESTUDO 3).

Cada um dos estudos pretendeu responder a diversas questões:

ESTUDO 1.

1.1) Determinar o número de bovinos infetados, por espécies do género *Sarcocystis*, abatidos da ilha Terceira;

1.2) Determinar o melhor local de colheita das amostras (músculo cardíaco ou músculo diafragmático) para a pesquisa de *Sarcocystis* spp.;

1.3) Identificar a melhor técnica laboratorial para pesquisa de parasitas do género *Sarcocystis* em bovinos;

1.4) Identificar as espécies de *Sarcocystis* presentes no gado bovino abatido da ilha Terceira, através da observação da espessura da parede dos cistos por microscopia ótica.

ESTUDO 2)

2.1) Determinar a prevalência de cisticercose entre 2007 e 2013, nos bovinos nascidos nos Açores e abatidos na RAM, dividindo-os em dois grupos, um com os animais abatidos antes das 6 semanas de permanência na Madeira (Aç1) (tempo mínimo para que se possa

fazer a observação macroscópica dos cistos) e outro com os animais abatidos depois desse período de tempo (Aç2);

2.2) Determinar as ilhas de origem dos animais positivos do grupo Aç1, assim como prevalências de casos de CB por ilha de nascimento desses animais;

2.3) Determinar a evolução anual da prevalência de CB dos bovinos do grupo Aç1, comparativamente aos nascidos na Madeira (nRAM) e ao total de bovinos abatidos na RAM entre 2007 e 2013.

ESTUDO 3)

3.1) Pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus bovis*, em bovinos nascidos na Ilha Terceira, transportados em vida e abatidos na Região Autónoma da Madeira, aquando do embarque dos mesmos, através do teste serológico *Bovine Cysticercosis* antibody (CYT Ab) ELISA kit® (GENTAUR) e comparação dos dados obtidos com os resultados de Inspeção Sanitária levada a cabo no matadouro da Ilha Madeira.

3.2 ESTUDO 1.

3.2.1 Material e métodos

Caracterização da amostra

O presente estudo teve como base os bovinos abatidos no Matadouro Industrial da ilha Terceira (MIT) situado no concelho da Praia da Vitória dessa Ilha do Arquipélago dos Açores. Neste matadouro são abatidos bovinos provenientes de diversas explorações tanto da ilha Terceira como de outras ilhas do Grupo Central do Arquipélago. O grosso dos animais abatidos neste matadouro provém da Ilha Terceira e é constituído por vacas de leite (Holstein Frisia), refugadas das explorações leiteiras, novilhos Holstein Frisia puros, cruzamentos desta raça com outras de carne, nascidos nas explorações leiteiras e engordados em viteiros e novilhos de raças de carne criados em extensivo.

Para a determinação do grau de infeção por espécies do género *Sarcocystis* da carne de bovino aprovada para consumo humano no MIT, amostras de músculo cardíaco e de diafragma foram colhidas aleatoriamente de entre os animais abatidos neste matadouro. Para este feito, foram colhidas amostras de 48 bovinos entre Dezembro de 2012 e Março de 2013.

Após a colheita, as amostras foram acondicionadas, individualmente, em saco de plástico e encaminhadas para o Laboratório Regional de Veterinária dos Açores (LRVA), num período de tempo inferior a 2 horas.

No LRVA cada amostra foi dividida em duas subamostras: uma, colocada em formol e enviada para o Setor de Patologia para análise histológica e a outra, enviada à temperatura de refrigeração, para o Setor de Parasitologia para ser submetida a digestão enzimática.

Cortes Histológicos

Para a preparação dos cortes histológicos as amostras colhidas no MIT foram processadas de acordo com o Procedimento Técnico do LRVA (2009).

Ao chegarem ao LRVA, as amostras foram cortadas de forma a assegurar uma fixação adequada (1 cm³) e colocadas em formol por 24h. Ao fim de um dia, as amostras foram colocadas num processador automático de tecidos onde foi efetuada a desidratação, através da remoção dos fluidos aquosos e lípidos tissulares, com álcool de concentrações crescentes, começando pela imersão do tecido em álcool a 70%, álcool a 95% e finalmente álcool absoluto. Procedeu-se de seguida ao esclarecimento ou diafanização, que consistiu no tratamento dos blocos de tecido, após desidratação, com um reagente (xilol) que é miscível

tanto com o álcool como com a parafina (utilizada no passo seguinte do processo) e que por sua vez pode ser eliminado na impregnação desta.

A impregnação em parafina substitui o agente diafanizador presente nos tecidos, formando um bloco sólido, tornando mais fácil o corte de tecidos em secções finas. Os cortes foram efetuados ao micrótomo. O corte ao micrótomo permite a obtenção de secções 3 a 5 µm para coloração pela técnica de Hematoxilina Eosina (HE) conforme descrito na Instrução de Trabalho LRVA (2014).

Os cortes histológicos foram examinados em microscópio ótico com aumento de 100X, 200X, 400X e 1000X (objetiva de imersão), para a pesquisa de cistos. Foram identificadas as espécies de *Sarcocystis* presentes nas amostras positivas no exame histológico, de acordo com critérios baseados na forma e espessura da parede dos cistos (Ruas, Cunha & Silva, 2001).

Digestão Enzimática

Para a Digestão Enzimática utilizou-se a técnica descrita no Regulamento (CE) nº.2075/2005 para a Triquinelose modificada. Triturou-se dez grama por amostra de músculo (cardíaco e diafragma) colhida no Matadouro e adicionadas a uma mistura de 1,6±0,5ml de ácido clorídrico com 1±0,2g de pepsina em 200ml de água a 44-46 °C por 60 minutos com agitador magnético.

Ao fim de 1 hora, as amostras digeridas foram filtradas para um copo (ampola de decantação), passando-as pela peneira/crivo em inox com malha de 180µm e deixadas a sedimentar durante 30 minutos, na ampola de decantação. Em seguida, o sedimento foi colhido, para uma proveta graduada, num total de 40 ml do fluido digerido, num só movimento da torneira/válvula da ampola de decantação, deixando-se repousar por mais 10 minutos (Figura 9), depois dos 10 minutos, uma gota do substrato foi retirada para uma lâmina e corada com coloração de Giemsa para observação ao microscópio ótico, nas ampliações de 100X, 200X e 400X.



Figura 9: Prova de digestão enzimática péptico-ácida. Digestão da amostra, sobre placa aquecida a 44-46 °C (esquerda). Filtração e sedimentação (direita) (Original).

Tratamento Estatístico

A fim de avaliar qual o melhor grupo muscular para analisar a presença de *Sarcocystis* spp. para os diferentes testes empregues, foi utilizado o método do Chi-quadrado. Para testar a sensibilidade de cada um dos métodos de diagnóstico (DE e EH) nos diferentes grupos musculares foi utilizado o teste exato de McNemar. Todas as análises estatísticas foram realizadas com recurso ao programa R-3.1.0, com um nível de $p < 0,05$.

3.2.2 Resultados

Dos 48 bovinos selecionados aleatoriamente para o presente estudo, 30 eram fêmeas e 18 eram machos, com idades compreendidas entre os 12 e os 133 meses (entre 1 e 11 anos). As fêmeas selecionadas tinham em média 60 meses de idade, com um máximo de 133 e mínimo de 17 meses, ao passo que os machos tinham uma média de 19 meses de idade e com máximo de 29 e mínimo de 12 meses. Para os 48 animais a média situou-se nos 45 meses.

Nos exames a fresco, realizados por digestão enzimática (DE) (Figura 10), os resultados foram positivos para todas as amostras de músculo cardíaco ($n= 48$) e positivas para 72,92% das amostras de diafragma ($n= 35$).

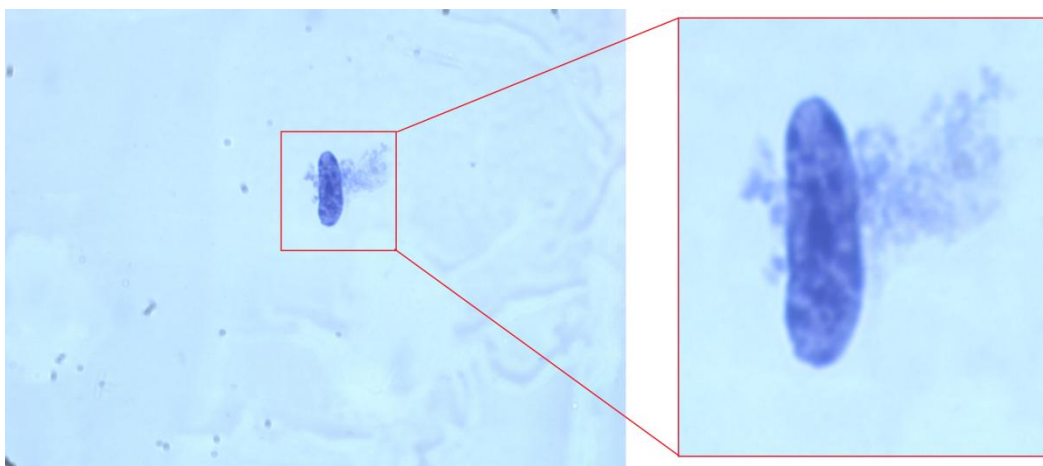


Figura 10: Bradizoíto de *Sarcocystis* spp. obtido por digestão enzimática de miocárdio de bovinos abatidos no MIT e observado ao microscópio ótico (400X) com coloração de Giemsa (Original).

Nos exames histológicos (EH) (Figura 11) os resultados foram positivos para 85,42% das amostras de músculo cardíaco (n= 41) e 64,58% das amostras de diafragma (n= 31) (Tabela 4).

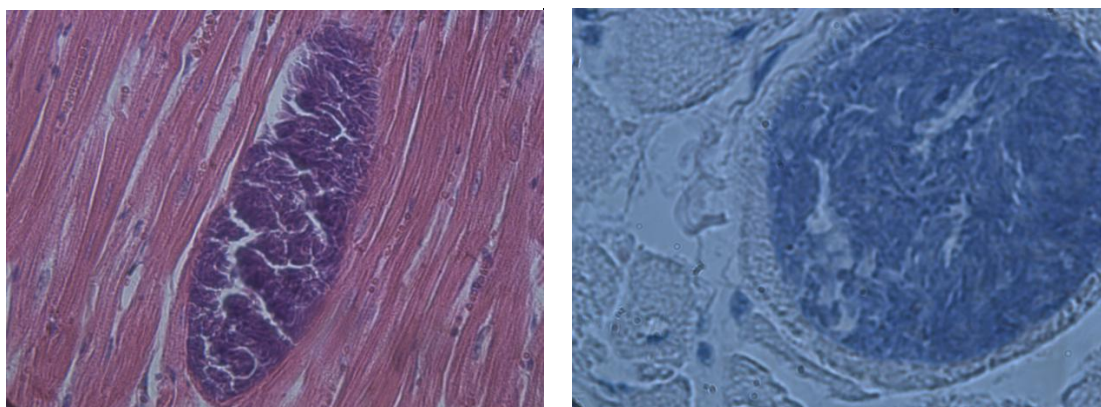


Figura 11: Cistos de *Sarcocystis* spp. em miocárdio de bovino à esquerda (ampliação de 400X) e diafragma à direita (ampliação de 1000X), observados em corte histológico e corados com HE (Original).

Tabela 4: Resultados do número de amostras positivas a *Sarcocystis* spp. para os diferentes grupos musculares e técnicas utilizados.

	Músculo Cardíaco		Diafragma	
	EH	DE	EH	DE
n= 48	41	48	31	35
%	85,42	100	64,58	72,92

A Tabela 5 apresenta o resultado do teste estatístico realizado com as diferentes proporções de cistos presentes nos músculos estudados. O miocárdio, por ter apresentado o maior número de casos positivos nas duas técnicas, 100% pela técnica de digestão enzimática e 85,42% no exame histológico, foi escolhido como padrão ouro do teste estatístico.

Ao analisar a Tabela 5 verifica-se que para qualquer uma das técnicas houve diferenças significativas entre os músculos utilizados, $\chi^2= 33,03$ e $P<0,01$ para digestão enzimática e $\chi^2= 13,92$ e $P<0,01$ no exame histológico, sendo o miocárdio o músculo com os melhores resultados para a detecção de *Sarcocystis* spp.

Tabela 5: Resultados do teste de sensibilidade para as técnicas de digestão enzimática (DE) e exame histológico (EH) nos diferentes músculos, naturalmente infetados com *Sarcocystis* spp..

Músculo	DE (%)	χ^2	P	EH (%)	χ^2	P
Cardíaco	100	-	-	85,42	-	-
Diafragma	72,92	33,03	$P<0,01$	64,58	13,92	$P<0,01$

Relativamente às duas técnicas empregues (Tabela 6), a análise estatística demonstrou a maior sensibilidade da DE comparativamente à EH, para um intervalo de confiança de 95% no caso do músculo cardíaco ($P< 0,05$). Já em relação ao diafragma, não foram encontradas diferenças significativas entre as duas técnicas ($P>0,05$).

Tabela 6: Análise comparativa da frequência de *Sarcocystis* spp. pelas técnicas de DE e EH nos músculos testados (teste exato de McNemar).

Músculo	DE (%)	EH (%)	χ^2	P
Cardíaco	100	85,42	1,44	0,01
Diafragma	72,92	64,58	1,57	0,48

Todos os sarcocistos, encontrados por microscopia ótica nas amostras de músculo cardíaco ($n= 41$) e diafragma ($n= 31$) positivas ao exame histológico, eram de parede fina, compatível com *Sarcocystis cruzi*.

3.3 ESTUDO 2.

3.3.1 Material e métodos

Caracterização da amostra

A partir da base de dados do Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA), gentilmente cedida pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), foi obtida uma lista de todos os bovinos abatidos na RAM entre os anos de 2007 e 2013 e respetivas movimentações. Essa listagem foi cruzada com os registos de reprovações, parciais e totais, de carcaças por presença de cisticercos de *Cysticercus bovis*, levadas a cabo na região. Dados cedidos pelos Serviços de Qualidade e Segurança Alimentar da Direção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural da RAM.

Assim, reuniram-se os seguintes dados para os anos de 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012 e 2013:

- a) Número total de bovinos abatidos na RAM;
- b) Número total de casos de cisticercose detetados na RAM;
- c) Número de bovinos abatidos, nascidos na RAM (nRAM);
- d) Número de casos de cisticercose nos bovinos nRAM;
- e) Número de bovinos abatidos na RAM, nascidos nos Açores (nAç);
 - a. Número de bovinos oriundos dos Açores que permaneceram menos de 6 semanas na RAM (Aç1);
 - b. Número de bovinos oriundos dos Açores que permaneceram mais de 6 semanas na RAM (Aç2);
- f) Número de casos de cisticercose nos bovinos oriundos dos Açores;
 - a. Número de casos de cisticercose em Aç1;
 - b. Número de casos de cisticercose em Aç2;
- g) Número de bovinos abatidos, nascidos fora das regiões autónomas (nFRA);
- h) Número de casos de cisticercose nos bovinos nFRA.

Contrariamente a outros trabalhos realizados sobre este assunto (Santos et al., 1991; Fonseca & Spínola 2000; Afonso, 2008; França Dória, 2011), onde foram utilizadas as 18 semanas de permanência na RAM como o tempo para diferenciar infeções adquiridas no ponto de origem dos animais das que tenham ocorrido na RAM, neste estudo utilizou-se as 6 semanas para fazer essa distinção, uma vez que a partir deste limite após a ingestão de ovos de *Taenia saginata*, já é possível observar os cisticercos, apesar destes completarem o seu

desenvolvimento às 18 semanas. Como não se pode determinar o grau de desenvolvimento dos cisticercos detetados, definimos todos os casos de CB detetados antes das 6 semanas como tendo sido infetados no Açores e todos os outros como impossíveis de detetar a origem da sua infeção.

Tratamento estatístico

Os dados foram trabalhados em Microsoft Access® 2010. A prevalência anual foi determinada de acordo com o local de origem dos animais, Madeira, Açores e externos às Regiões Autónomas Portuguesas. No caso dos Açores, a prevalência foi ainda determinada de acordo com o tempo de permanência na RAM. A significância estatística das diferenças entre prevalências dos diferentes grupos foi calculada pelo teste exato de Fisher.

As prevalências anuais, de 2007 a 2013, para o total de animais abatidos, nascidos na Madeira e nascidos nos Açores, abatidos antes das 6 semanas de chegada à RAM foram analisadas por regressão linear, calculando-se o R^2 para determinar a correlação ao longo do tempo.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com recurso ao programa EpiTools 2014 AusVet Animal Health Services.

3.3.2 Resultados

De acordo com os dados do SNIRA, no período de tempo que decorreu entre 1 de janeiro de 2007 e 31 de dezembro de 2013 foram abatidos na RAM 39450 bovinos, dos quais, 5533 eram locais (nRAM), 33697 nasceram no Arquipélago dos Açores (nAç) e 220 eram oriundos de Portugal continental e outros países da União Europeia (Tabela 7).

Dos bovinos nascidos no Arquipélago dos Açores, 16952 (50,31%) foram abatidos antes das 6 semanas de permanência na RAM, tendo os restantes 16745 (49,69%) permanecido mais de 6 semanas até serem abatidos (Tabela 8).

Nesse intervalo de tempo foram detetados, pelos Inspectores Sanitários da Região, 2331 casos de animais com *Cysticercus bovis*, que representam 5,91% dos animais abatidos na RAM entre os anos de 2007 e 2013. Destes, 188 carcaças foram rejeitadas e as restantes 2143 sofreram reprovações parciais.

Tabela 7: Quadro-resumo referente aos abates na RAM.

Ano	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	[2007-2013]
Nº total de bovinos abatidos	7236	6571	5796	5398	4914	4811	4724	39450
Nº de bovinos abatidos, nascidos na RAM (ncRAM)	770	734	752	832	817	857	771	5533
% ncRAM sobre Total de bovinos abatidos	10,64	11,17	12,97	15,41	16,63	17,81	16,32	14,03
Nº de bovinos abatidos, nascidos na RAA (nAç)	6396	5771	5007	4550	4090	3942	3941	33697
% nAç sobre Total de bovinos abatidos	88,39	87,83	86,39	84,29	83,23	81,94	83,43	85,42
Nº de bovinos abatidos, nascidos fora das regiões autónomas (nFRA)	70	66	37	16	7	12	12	220
% ncFRA sobre Total de bovinos abatidos	0,97	1,00	0,64	0,30	0,14	0,25	0,25	0,56

Ao cruzar as duas bases de dados 36 animais dos rejeitados não foram encontrados no SNIRA, tendo sido excluídos da análise de dados. Assim trabalhamos com os 2295 dos 2331 casos de Cisticercose detetados na RAM.

Dos 2295 casos positivos, 529 nasceram na RAM ou seja 23% do total de casos, 1,34% do total de abates e 9,56% dos bovinos nascidos na RAM, 1765 eram provenientes dos Açores, representando 76,9% do total de casos de CB detetados.

Tabela 8: Quadro-resumo referente ao tempo de permanência na RAM até ao abate dos bovinos oriundos da RAA.

Ano	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	[2007-2013]
Nº de bovinos abatidos, nascidos na RAA (nAç)	6396	5771	5007	4550	4090	3942	3941	33697
Nº de bovinos que permaneceram menos de 6 semanas (Aç<6s)	4422	3677	2618	1939	1585	1509	1202	16952
% Aç<6s sobre total de bovinos abatidos, nascidos na RAA (nAç)	69,14	63,72	52,29	42,62	38,75	38,28	30,50	50,31
Nº de bovinos que permaneceram mais de 6 semanas (Aç>6s)	1974	2094	2389	2611	2505	2433	2739	16745
% Aç>6s sobre total de bovinos abatidos, nascidos na RAA (nAç)	30,86	36,28	47,71	57,38	61,25	61,72	69,50	49,69

Estes animais representam ainda 5,24% dos animais oriundos dos Açores abatidos na Madeira, assim como 4,47% do total de animais abatidos (Tabela 9).

As prevalências dos bovinos nascidos na RAM (9,56%) e na RAA (5,24%) foram significativamente diferentes ($P < 0,0001$).

No grupo de animais abatidos antes das 6 semanas de permanência na RAM, 136 foram positivos, 0,8% do total de animais provenientes dos Açores abatidos antes das 6 semanas de permanência na RAM. Dos restantes animais nascidos nos Açores, 1929 foram positivos, ou seja 9,73% desse grupo.

Neste intervalo de tempo, a prevalência de CB nos animais do grupo Aç1 (0,8%) foi significativamente inferior à dos bovinos locais (9,56%) e à dos Aç2 (9,73%) ($P < 0,01$). Já entre os animais nRAM e o grupo dos Aç2 não foi encontrada diferença significativa entre as prevalências de CB ($P > 0,05$).

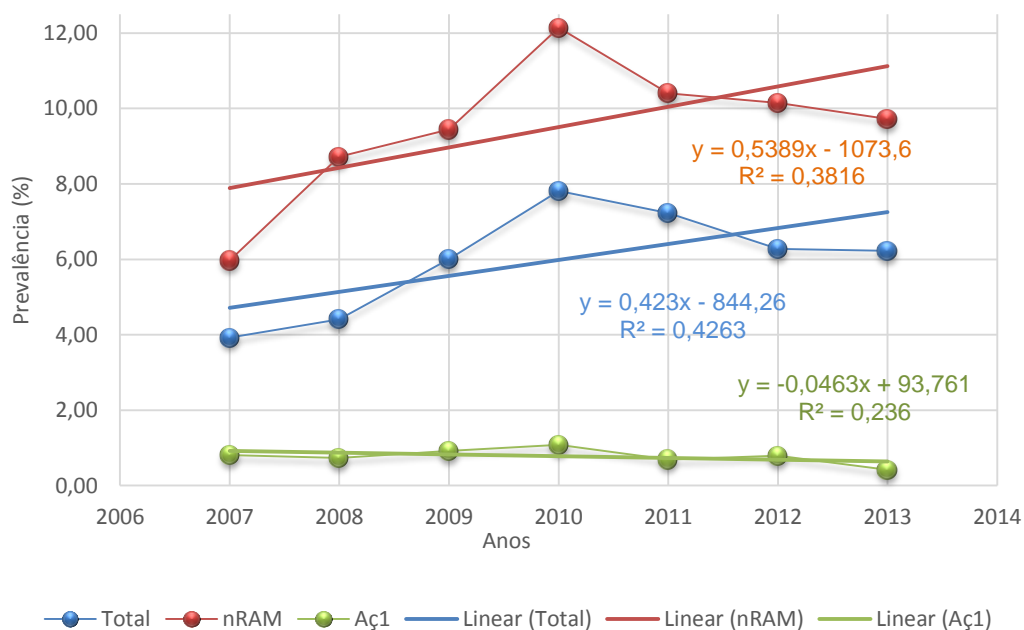
Tabela 9: Quadro-resumo referente aos casos de Cisticercose dos bovinos nascidos na RAM e RAA.

Ano	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	[2007-2013]
Nº bovinos detetados com Cisticercose na RAM	284	290	348	422	355	302	294	2295
% de bovinos detetados com Cisticercose / N.º bovinos abatidos	3,92	4,41	6,00	7,82	7,22	6,28	6,22	5,82
Nº bovinos detetados com Cisticercose, nascidos na RAM (nRAM)	46	64	71	101	85	87	75	529
% de bovinos nRAM detetados com Cisticercose / N.º bovinos abatido	5,97	8,72	9,44	12,14	10,40	10,15	9,73	9,56
Nº bovinos detetados com Cisticercose, nascidos na RAA (nAç)	238	226	277	321	270	215	218	1765
% de bovinos nAç detetados com Cisticercose / N.º bovinos abatido	3,72	3,92	5,53	7,05	6,60	5,45	5,53	5,24
Nº bovinos detetados com Cisticercose, nascidos na RAA e que permaneceram menos de 6 semanas na RAM até ao abate (Aç1)	36	27	24	21	11	12	5	136
% de Aç1 detetados com Cisticercose / N.º de bovinos que permaneceram menos de 6 semanas até ao abate	0,81	0,73	0,92	1,08	0,69	0,80	0,42	0,80
Nº bovinos detetados com Cisticercose, nascidos na RAA e que permaneceram mais de 6 semanas na RAM até ao abate (Aç2)	202	199	253	300	259	203	213	1629
% de Aç2 detetados com Cisticercose / N.º de bovinos que permaneceram mais de 6 semanas até ao abate	10,23	9,50	10,59	11,49	10,34	8,34	7,78	9,73

De acordo com a ilha de nascimento, a que forneceu um maior número de animais à RAM foi a ilha Terceira com 10016 bovinos, seguida da ilha de S. Miguel (6301) e ilha do Faial com 5452 bovinos. Por ilha, dos animais que foram abatidos antes das 6 semanas de permanência na RAM, a ilha Graciosa é aquela que apresenta uma maior prevalência (3,27%), seguido das ilhas de S^{ta}. Maria (2,94) e Faial (1,09), não tendo sido descrito qualquer caso nas ilhas do grupo Ocidental (Figura 12).

De 2007 a 2013 verificou-se um aumento na prevalência de CB nos bovinos abatidos na RAM ($R^2= 0,43$), bem como no grupo de animais nascidos nessa região autónoma ($R^2= 0,38$). Contrariamente a este crescimento, nos animais provenientes dos Açores e abatidos num prazo inferior a 6 semanas de permanência na Madeira houve um ligeiro decréscimo ($R^2= 0,236$) (Gráfico 5).

Gráfico 5: Prevalências de CB na RAM para o total de bovinos abatidos, nRAM e Aç1 entre os anos de 2007 e 2013



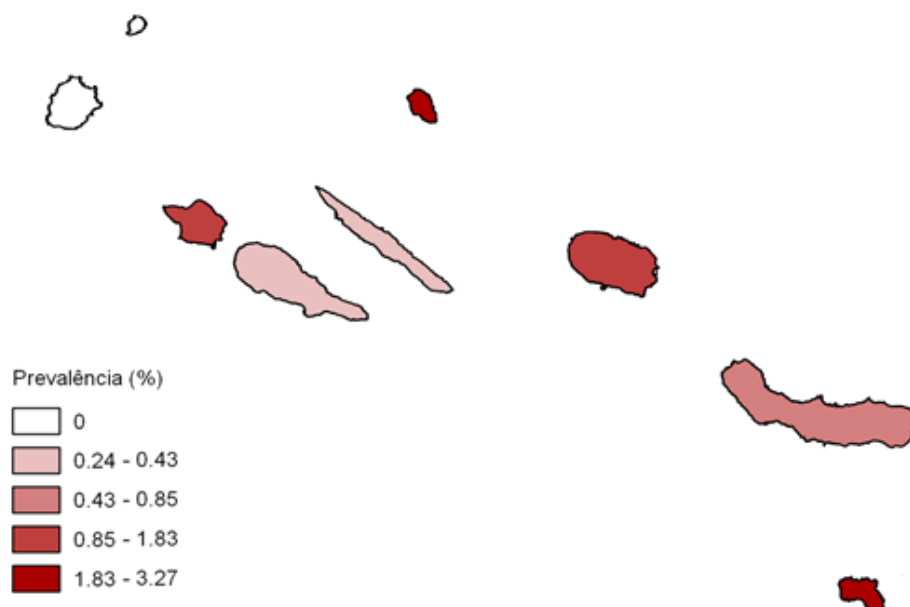


Figura 12: Prevalência de casos de CB na RAM, dos bovinos abatidos antes das 6 semanas de permanência na Madeira, por ilha de nascimento.

3.4 ESTUDO 3

3.4.1 Material e métodos

Caracterização da amostra

A seleção dos animais foi efetuada a partir de animais nascidos no Arquipélago dos Açores e embarcados no Porto Marítimo da Praia da Vitória durante o período de estágio, nos dias 14 e 28 de fevereiro de 2013, que tinham como destino a Ilha da Madeira. Destes bovinos foram recolhidas, antes do embarque, amostras de sangue da veia caudal para tubo seco. De seguida, as amostras foram encaminhadas para o Sector de Serologia do LRVA onde permaneceram por 24 horas à temperatura ambiente, sendo posteriormente centrifugados a 1500rpm durante 5 minutos. Após centrifugação das amostras, retirou-se o sobrenadante (soro) para microtubos, conservando-os a -80 °C até à realização do teste ELISA.

O tempo de permanência dos animais na RAM, até ao abate, foi obtido através do SNIRA e os dados relativos à identificação de casos de cisticercose neste grupo de animais por Inspeção Sanitária, foram fornecidos pela Direção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural da Região Autónoma da Madeira.

Para o estudo os animais testados foram divididos em três grupos, conforme o tempo de permanência na Madeira, um grupo de animais abatidos no prazo inferior a 6 semanas após a chegada à RAM, o segundo grupo de animais abatidos entre as 6 e 18 semanas de permanência na RAM e um terceiro grupo de animais que permaneceram mais de 18 semanas até ao abate.

Os grupos, baseados no período de tempo de permanência na RAM foram determinados com base no descrito por Gracey (1986) que descreve 18 meses como sendo o período necessário para o completo desenvolvimento dos cisticercos na musculatura dos bovinos, embora, em certos casos, a partir das 6 semanas já seja possível o seu diagnóstico.

ELISA

Na pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus bovis* foi utilizado um teste ELISA de competição, Bovine Cysticercosis antibody (CYT Ab) ELISA kit® (GENTAUR).

Este teste consiste na incubação da amostra (soro sanguíneo) com o anticorpo anti-*Cysticercus* marcado (anti-CYT-HRP) fornecido pelo kit, na placa de poços revestidos com o antígeno por uma hora. Depois do período de incubação, os poços são decantados e lavados

com solução de lavagem cinco vezes. Os poços são posteriormente incubados com o substrato para a enzima horseradish peroxidase (HRP). O resultado da reação entre a enzima HRP e o substrato é a formação de um complexo de cor azul nos locais onde os anti-CYT-HRP aderiram no fundo do poço. Por fim, adiciona-se uma solução de paragem para parar a reação, o que vai tornar a solução amarela.

A intensidade da cor formada é medida espectrofotometricamente a 450 nm num leitor de microplacas BioRad Modelo 680. O valor das intensidades obtidas é inversamente proporcional à concentração de anticorpos anti-*Cysticercus bovis* da amostra, isto porque, os anticorpos anti-*Cysticercus bovis* da amostra e os complexos anti-CYT-HRP competem pelos antígenos presentes no fundo dos poços.

3.4.2 Resultados

Por motivo de ordem logística, as amostras testadas foram limitadas a 70 animais.

A idade média dos animais ao embarque foi de 20 meses, tendo sido o tempo de permanência médio na ilha da Madeira até ao abate de 10 semanas. O animal, que esteve menos tempo na ilha, permaneceu por 4 dias até ser abatido e o que esteve mais tempo, 201 dias (aproximadamente 29 semanas).

Dos 70 animais do estudo, três foram descartados, dois deles por terem sido dados como desaparecidos no SNIRA e o terceiro por não ter chegado a sair da Ilha Terceira. No entanto, os títulos de anticorpos destes animais foram de 729,5 ng/ml e 982,5 ng/ml respetivamente para os dois animais desaparecidos e de 15,9 ng/ml para o que não chegou a sair do Arquipélago dos Açores. Os restantes 67 foram abatidos no matadouro da Ilha Madeira, no período que decorreu de 18 de Fevereiro de 2013 a 3 de Setembro do mesmo ano, tendo sido detetados 7 animais positivos a CB pelos Inspectores Sanitários da Região, ou seja, 10,4% dos animais testados.

Para os diferentes grupos de animais baseados no tempo de permanência na Madeira (Tabela 10), o primeiro grupo, animais abatidos no prazo inferior a 6 semanas após a chegada à RAM, 32 animais com idade média ao embarque e ao abate de 22 meses, neste grupo foram detetados 2 casos de cisticercose por IS, o segundo grupo, animais abatidos entre as 6 e 18 semanas de permanência na RAM, 25 animais com idade média ao embarque de 19 meses e ao abate de 23 meses, neste grupo foram detetados 4 casos de cisticercose por IS, e no terceiro grupo, animais que permaneceram mais de 18 semanas até ao abate, composto por 10 animais com idade média ao embarque de 15 meses e ao abate de 20 meses, tendo sido detetado 1 caso de cisticercose neste grupo.

Tabela 10: Grupos de animais com base no tempo de permanência na RAM até ao abate.

	<6 Semana	[6-18] Semana	>18 Semanas	Outros	Total
<i>n</i>	32	25	10	3*	70
Média de idade ao embarque (meses)	22	19	15	-	18,67
Média de idade ao abate (meses)	22	23	20	-	21,67
Casos de Cisticercose detetados por I.S.	2	4	1	-	7

* Animais que não chegaram a ser abatidos, 2 foram dados como desaparecidos e 1 não chegou a sair da Ilha Terceira

ELISA

Das 70 amostras testadas 3 foram descartadas, pelos motivos mencionados no ponto anterior, das restantes 67 amostras as concentrações de anticorpos obtidas pelo teste serológico variaram entre 16,4 ng/ml e 828,9 ng/ml. Tendo-se situado a maioria dos animais ($n= 57$) no intervalo de concentração de 0-200 ng/ml, 1 animal no intervalo de 200-300 ng/ml e 9 animais com mais de 300 ng/ml.

Relacionando o título de Ac ao embarque com o tempo de permanência no Arquipélago da Madeira (Gráfico 6), observa-se que dos 32 animais abatidos antes das 6 semanas de permanência na RAM, 29 apresentavam títulos de Ac inferiores a 200 ng/ml, um tinha título de Ac no intervalo de 200-300 ng/ml e dois tinham títulos superiores a 300 ng/ml, um com 473,5 ng/ml e o outro com 828,9 ng/ml, a concentração. mais elevada de Ac do estudo. Do grupo de animais abatidos entre as 6 e as 18 semanas de estadia na RAM ($n= 25$), 19 animais apresentaram títulos inferiores a 200 ng/ml e 6 animais títulos superiores a 300 ng/ml. Por fim, dos 10 animais abatidos para além das 18 semanas de chegada ao arquipélago apenas 1 apresentava um título de Ac. superior a 300 ng/ml, tendo esse animal 19 meses de idade à altura da colheita de sangue. Todos os restantes animais tinham títulos inferiores a 200 ng/ml.

Relação entre deteção em IS e título de Ac

Dos 67 animais utilizados para o presente estudo, 7 foram rejeitados no matadouro por possuírem cisticercos. Destes, dois foram abatidos no prazo de tempo inferior a 6 semanas de permanência na Madeira, quatro permaneceram entre 6 a 18 semanas e um teve mais de 18 semanas na região.

Os primeiros dois animais positivos a IS na RAM, apresentaram ao embarque títulos de Ac de 828,9 ng/ml e 473,5 ng/ml, tendo respetivamente 20 e 24 meses de idade. Dos animais rejeitados do segundo grupo (6-18 semanas), dois apresentavam títulos superiores a 300

ng/ml, 404,5 ng/ml e 620,4 ng/ml e idades ao embarque de 14 e 25 meses. Os outros dois animais tinham concentrações inferiores a 200 ng/ml, 152,6 ng/ml e 103,2 ng/ml, com 23 e 26 meses de idade ao embarque respetivamente. O animal abatido, com mais de 18 semanas de permanência na Madeira e rejeitado, tinha um título de 91,4 ng/ml e 18 meses de idade ao embarque (Tabela 11).

Gráfico 6 : Título de Ac (ng/ml) ao embarque dos bovinos nascidos na RAA e abatidos na RAM

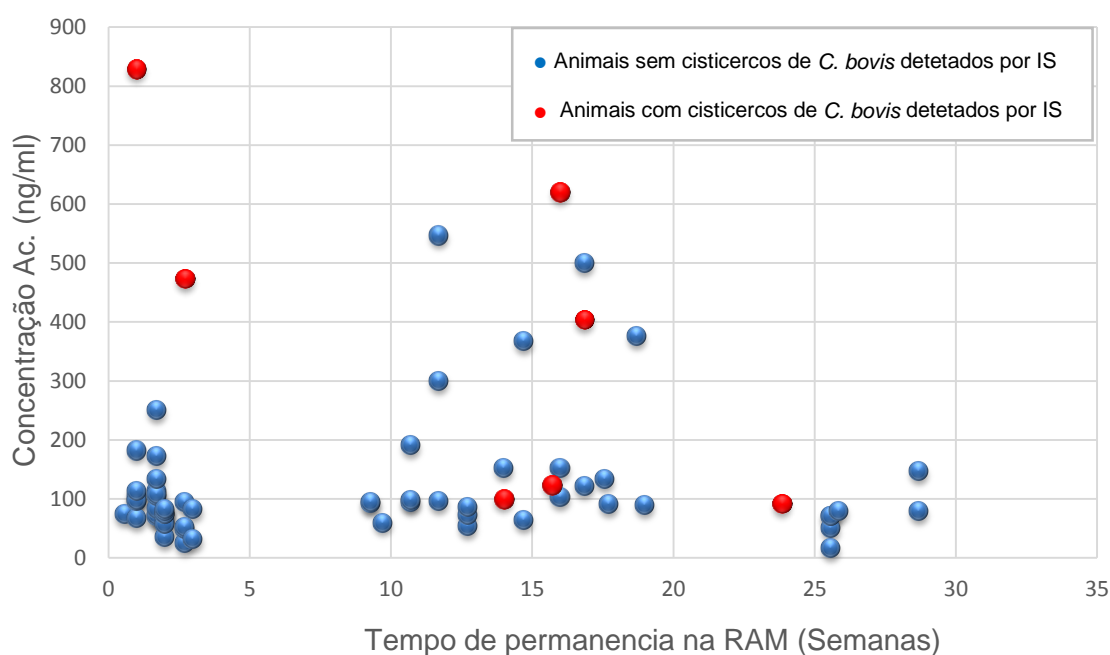


Tabela 11: Relação entre os casos de rejeição em IS e o título de Ac obtido ao embarque.

Tempo de permanência na RAM	Idade ao embarque (meses)	Idade ao abate (meses)	Concentração Ac. (ng/ml)
< 6 semanas	20	21	828,9
	24	24	473,5
[6-18] semanas	23	26	152,6
	26	30	103,2
	25	29	620,4
	14	18	404,5
>18 semanas	18	23	91,4

3.5 Discussão

Das amostras de músculo selecionadas para a deteção de animais com sarcocistiose bovina, o miocárdio apresentou melhores resultados, quer para a análise por digestão enzimática (DE) quer para a pesquisa no exame histológico (EH). Nas amostras de coração, 100% e 85,42% foram positivos para a presença de *Sarcocystis* spp. nos métodos de DE e EH, respetivamente. Nas amostras de diafragma o número de casos positivos identificados foi relativamente menor, quer para a DE (72,92%) quer para o EH (64,58%), tendo havido diferença significativa entre os músculos escolhidos ($P < 0,01$).

O fato do coração ter apresentado mais casos positivos comparativamente com outros grupos musculares está de acordo com os resultados obtidos em Portugal, por Carvalho (1991), com bovinos da Estremadura, Ribatejo, Alentejo e Açores, abatidos no Matadouro Industrial de Lisboa e obtidos por Ruas et al. (2001) no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

De acordo com Carvalho (1991), em Portugal, o resultado da DE em músculo cardíaco foi o mais elevado (97,7%), comparativamente ao do EH para o mesmo músculo (54,7%). No Brasil, Ruas et al. (2001) também concluíram que o miocárdio dos bovinos, era mais sensível para a pesquisa de *Sarcocystis* spp. que outros grupos musculares como o diafragma, o masséter, o esófago e os intercostais.

A maior prevalência de *Sarcocystis* spp. no miocárdio deve-se ao fato deste ser geralmente considerado um local de eleição dos sarcocistos de *S. cruzi*, espécie largamente maioritária nos bovinos (Carvalho, 1991).

Relativamente às técnicas utilizadas para a identificação de *Sarcocystis* spp. em miocárdio de bovino, verificou-se que a digestão enzimática é significativamente mais sensível do que o exame histológico ($P < 0,01$), o mesmo foi concluído em estudos anteriormente realizados por Pivato (1986), Carvalho (1991) e Ruas et al., (2001).

A razão pela qual a DE aparenta ser mais sensível que o exame histológico na pesquisa de *Sarcocystis* spp. nos dois grupos musculares estudados pode ser justificada pelo volume de músculo utilizado, uma vez que na DE a quantidade de amostra é maior aumentando assim a probabilidade de deteção de casos positivos.

Além da sensibilidade a técnica de DE é de fácil execução, rápida e mais económica comparativamente ao exame histológico.

A maior vantagem do EH é a possibilidade de identificação das espécies de *Sarcocystis*, através da espessura da parede dos sarcocistos, pois neste caso, *S. cruzi*, é identificado por possuir parede fina e as outras espécies por possuírem parede espessa. Alguns autores consideram difícil a distinção entre as espécies de parede espessa apenas com base na

morfologia, preferindo considerá-las indistintamente como “espécies com cistos de parede espessa” (Carvalho 1991). Outros investigadores defendem que é possível distinguir ultra estruturalmente os sarcocistos de *Sarcocystis hirsuta* dos de *Sarcocystis hominis*, pois os primeiros apresentam projeções vilosas com uma constrição na base e expandidas na região média e a sua porção distal encontra-se inclinada num ângulo de 45° a 90° em relação à superfície do sarcocisto. Na espécie *S. hominis*, as projeções são cilíndricas e orientadas perpendicularmente à superfície do sarcocisto (Dubey et al., 1989a). Na espécie *Sarcocystis sinensis*, pela sua grande semelhança morfológica a *S. hominis*, é impossível de diferenciar através do exame histológico (Moré et al., 2014).

O método mais fiável para a identificação das espécies de *Sarcocystis* é a microscopia eletrónica, que permite uma melhor distinção da estrutura da parede do sarcocisto e a identificação dos organelos dos merozoítos e bradizoítos (Fayer, 2004). No entanto a microscopia eletrónica é um método moroso, dispendioso e que requer material e pessoal especializado, não sendo uma boa alternativa para estudos epidemiológicos e de avaliação dos riscos para a Saúde Pública.

A ausência de um método fiável para o estudo sobre a presença de *Sarcocystis* spp. nos bovinos destacado pela EFSA em 2010 (Chiesa et al., 2013) levou ao desenvolvimento de uma nova técnica molecular, baseada na PCR, para avaliar a ocorrência de *Sarcocystis* spp. nos bovinos, que apesar de ainda estar na fase inicial de desenvolvimento apresenta resultados promissores (Chiesa et al., 2013). A técnica de DE apesar de não permitir a identificação das espécies envolvidas na infeção de bovinos é útil na deteção de casos positivos de sarcocistiose que poderão ser utilizados para posterior identificação das espécies pela técnica de PCR descrita por Chiesa et al., (2013).

A elevada prevalência de *Sarcocystis* spp. encontrada nos bovinos abatidos para consumo humano no MIT está de acordo com a situação encontrada no Matadouro Industrial de Lisboa por Carvalho (1991) bem como noutros Países, como no Brasil (Ruas et. al, 2001), na Bélgica (Domenis et. al, 2011), Itália (Vangeel et. al, 2007; Chiesa et. al, 2013) e Alemanha (Moré et. al, 2014). Contudo, contrariamente a estes estudos, não foi encontrado qualquer caso da presença de cistos de parede espessa, tendo sido identificados apenas cistos de paredes finas, compatíveis com cistos de *S. cruzi*.

A ausência de sarcocistos de parede espessa no presente estudo pode ser explicada por diversos fatores: a predisposição do *S. hirsuta* e *S. hominis* pelo músculo esofágico (Carvalho, 1991), a menor prevalência destas espécies comparativamente ao *S. cruzi*, e o reduzido número de bovinos analisados (n=48). Tendo em conta estes fatores não nos é permitido declarar a inexistência de *S. hirsuta*, *S. hominis* e *S. sinensis* em bovinos abatidos no MIT.

Para contrariar as limitações encontradas para a determinação das espécies envolvidas na sarcocistiose bovina, a técnica de PCR desenvolvida por Chiesa (2013) seria uma boa alternativa.

Relativamente à cisticercose bovina, ao analisar os registos das reprovações por CB entre 2007 e 2013 na RAM, observou-se que a prevalência deste parasita tem vindo a aumentar, tal como descrito por Afonso (2008) e França Dória (2011). Este aumento no total de casos detetados foi acompanhado por um aumento dos casos de CB nos animais nascidos na Madeira, indicando que na RAM este problema tem vindo a agravar-se.

Comparando a prevalência de casos registados nos animais nascidos na RAM (9,56%) com a dos animais nascidos nos Açores (5,24%) comprova-se que há uma diferença significativa ($P < 0,01$) devido à origem dos animais, havendo um maior risco de infeção para os animais nascidos na RAM.

No total de animais detetados provenientes dos Açores é extremamente difícil determinar a origem da infeção, principalmente para os que permanecem mais tempo na RAM. Contudo, a existência de casos de CB no grupo Aç1 (animais abatidos antes das 6 semanas de permanência na RAM), comprova de forma inequívoca que foram infetados ainda nos Açores, pois mesmo que tenham ingerido ovos de *T. saginata* na RAM, o período de tempo que decorre da infeção ao abate não seria suficiente para que os cistos pudessem ser detetados pelos Inspetores Sanitários. O mesmo intervalo temporal foi utilizado por Meiry, Brenner, Markovits e Klement (2012) para determinar o local de infeção de bovinos importados por Israel entre 1973 e 2008.

Estes resultados veem ao encontro das conclusões de Santos e seus colaboradores (1991), Fonseca e Spínola (2000), Afonso (2008). e França Dória (2011), embora, nestes estudos o intervalo de tempo de permanência na RAM utilizado para diferenciar animais infetados dos não infetados nos Açores não consiga afirmar com certeza o local de infeção ter variado das 16 às 18 semanas, tempo necessário para que se dê a maturação dos cisticercos.

Ao comparar as prevalências do grupo Aç1 (0,8%) e dos animais nascidos na RAM (9,56%) verificou-se que a prevalência do grupo Aç1 é significativamente inferior à dos nascidos na RAM, entre os animais nascidos na Madeira e os animais nascidos nos Açores e abatidos depois das 6 semanas de permanência na RAM, grupo Aç2 (9,73%), não houve diferença significativa.

A grande diferença entre as prevalências dos dois grupos dos Açores (Aç1 e Aç2) é um indicador de que a probabilidade de um animal se infetar nos Açores é consideravelmente inferior à probabilidade de se infetar na Madeira. Este fato pode ser uma das razões para que nos Açores, até à data, não tenham sido identificadas carcaças infetadas com CB.

No entanto, a impossibilidade de se definir a origem das infeções para os animais do grupo Aç2, podendo haver inclusive animais que se infetam nas duas regiões, leva a que a prevalência de animais infetados nos Açores seja na realidade mais elevada que a encontrada para o grupo Aç1.

No que diz respeito aos animais positivos no grupo Aç1, devido à grande dinâmica de movimentações destes animais, as explorações de nascimento podem não ser os locais onde ocorreu a infeção. Desta forma torna-se difícil identificar ao certo o local de infeção estudando apenas os dados fornecidos pelo SNIRA. Um estudo mais aprofundado das explorações de nascimento e das explorações de passagem desses animais seria importante para identificar os locais de risco na região. Contudo, analisado apenas por ilhas de nascimento dos animais do grupo Aç1 é de notar que as ilhas que apresentam maiores prevalências foram as mesmas identificadas por Afonso (2008) para os anos de 2005 e 2006, Santa Maria, Graciosa, Faial e Terceira, o que pode indicar focos de infeção para as mesmas.

Em relação aos animais testados, para pesquisa de anticorpos anti- *Cysticercus bovis*, o teste utilizado, Bovine Cysticercosis antibody (CYT Ab) ELISA kit® (GENTAUR), não é um teste indicado para ser utilizado como método de diagnóstico para que se chegue a uma decisão sanitária, pois, tal como descrito por Monteiro, Pinto & Dias (2006) e Paulan et al. (2013) a quantificação de anticorpos antiparasitários induz a um grande número de falsos negativos em animais naturalmente infetados quando comparados com animais infetados experimentalmente, implicando também o surgimento de animais positivos ao teste mas que não apresentem formas infetantes do parasita (Paulan et al. 2013).

No entanto, o objetivo deste estudo não foi a identificação de animais infetados mas sim, determinar se os animais exportados para a Madeira, a partir dos Açores, estiveram em contato com o agente parasitário na região de origem. Devido à impossibilidade de ter controlos positivos e negativos neste estudo impediu-os a obtenção de um cut-off válido para determinar a partir de que concentração se considerava ter havido contato entre parasita e hospedeiro tal como descrito por Paulan et al. (2013). Assim, a presunção desse contato foi tomada a partir do cruzamento das concentrações obtidas e a decisão sanitária tomada. Tendo em conta, igualmente, o tempo de permanência dos animais na RAM.

Assim, ao cruzar os animais que tinham as concentrações de anticorpos mais elevadas (superior a 400 ng/ml) com os dados das reprovações na RAM concluiu-se que para estes, a infeção teve lugar na ilha Terceira. Este fato é fácil de comprovar para os dois primeiros animais que foram positivos na inspeção sanitária, já que foram abatidos antes das 6 semanas de permanência na RAM (Gráfico 6).

Todos os outros animais abatidos neste intervalo de tempo, apresentaram concentrações inferiores a 300 ng/ml, tendo a grande maioria concentrações inferiores a 100 ng/ml. O que pela impossibilidade de obtenção de um cut-off fiável não nos permite afirmar categoricamente se tiveram ou não contato com o parasita nos Açores.

Dos cinco animais abatidos após as 6 semanas de permanência na RAM e detetados na IS dois deles apresentaram níveis de anticorpos superior a 400 ng/ml, os restantes três apresentaram níveis de anticorpos relativamente baixos (inferiores a 150 ng/ml). Os animais com Ac elevados foram abatidos no intervalo de tempo que permitiria a deteção da infeção em matadouro mesmo que tivessem adquirido a infeção na Madeira. No entanto, como a concentração de anticorpos detetada na Terceira foi semelhante à dos animais positivos na IS abatidos antes das 6 semanas depois do desembarque, depreende-se que estiveram em contato com o agente parasitário nos Açores e que muito provavelmente já estariam infetados quando chegaram à Madeira.

Quanto aos animais com as concentrações de Ac baixas (inferiores a 150 ng/ml) pode supor-se que tenham vindo a adquirir a infeção na RAM, havendo tempo suficiente para o desenvolvimento do parasita no músculo já que estes animais foram abatidos às 14, 16 e 23 semanas após o desembarque. Não podemos contudo, afirmar com certeza que estes não tenham estado em contato com ovos de *T. saginata* nos Açores, pois existe a hipótese de terem adquirido a infeção nos Açores mas quando foram testados os níveis de Ac ainda se encontravam relativamente baixos.

3.6 Conclusão

O estudo da sarcocistiose na ilha Terceira demonstrou que a técnica de Digestão Enzimática de miocárdio é a mais eficaz na deteção de animais infetados com *Sarcocystis* spp.. Em trabalhos futuros poderá ser complementado com uma técnica molecular para avaliar a presença de *Sarcocystis hominis* nos bovinos abatidos na ilha Terceira.

Todos os bovinos abatidos para consumo humano no MIT se encontram infetados por *Sarcocystis cruzi*. Dada a grande resistência dos esporocistos no meio ambiente o melhor método para interromper o ciclo de vida do *S. cruzi* será atuar sobre o HD. Impedir a ingestão de carne de vaca crua ou mal confeccionada por parte dos cães, como os cães das explorações, e os cães de caça que frequentam as pastagens, é o primeiro passo pois estes representam o principal risco de contaminação de fontes de água e alimento dos bovinos.

Importante também é o controlo efetivo dos cães abandonados, pois apesar de não haver dados relativos a esta população de cães, existem diversos relatos de ataques a gado, sendo este um fator de perpetuação do ciclo.

A não deteção de *Sarcocystis hominis* e *S. hirsuta* neste estudo não implica a inexistência destas espécies nos bovinos da ilha, sendo necessária uma investigação mais aprofundada, nomeadamente na pesquisa de *S. hominis* no âmbito de se definir o risco para a Saúde Pública.

Uma outra vertente que merece uma futura abordagem é determinar a relação entre a presença de *Sarcocystis* spp. no músculo estriado de bovinos e a miosite eosinofílica, que é um dos principais motivos que levam à limpeza de carcaças de bovinos no MIT reduzindo o seu valor económico.

No caso da cisticercose bovina, tanto os resultados obtidos pelo teste ELISA, relativos à presença de concentrações elevadas de anticorpos anti-cisticercos nos animais antes do embarque com destino à Madeira, bem como a presença de casos de cisticercose nos animais abatidos antes das 6 semanas de permanência na RAM permite-nos concluir que parte dos animais oriundos dos Açores e abatidos para consumo humano na RAM infetam-se na região de origem.

Embora a prevalência dos animais considerados como efetivamente infetados nos Açores (0,8%) ser significativamente inferior ao total de casos detetados (5,82%), o número de animais que se infetam nos Açores poderá ser consideravelmente maior, isto porque, no grupo de animais abatidos depois das 6 semanas de permanência na RAM (1629 animais) ter sido impossível detetar o local de infeção dos animais.

Apesar de, conforme concluído no presente trabalho, a situação dos Açores não aparentar ser tão problemática como a verificada no arquipélago da Madeira, o surgimento de um surto

de cisticercose bovina nos Açores terá um forte impacto negativo não só para a Saúde Pública, como também para a imagem da *Carne dos Açores*, daí a necessidade de não se encarar este assunto de animo leve.

O total desconhecimento da dimensão epidemiológica da cisticercose bovina na Região Autónoma dos Açores torna premente um estudo epidemiológico na região que envolva as autoridades regionais de saúde e veterinárias, para determinar a real magnitude desta zoonose.

Será do interesse de ambas as regiões autónomas o melhoramento da comunicação entre as autoridades responsáveis por forma a delinear estratégias conjuntas de controlo e erradicação do problema.

A padronização dos procedimentos do ato de inspeção *post-mortem* com vista a uma mais eficaz deteção de cistos de *Cysticercus bovis* dos dois arquipélagos, bem como uma maior sensibilização das equipas de Inspeção Sanitária dos matadouros da Região Autónoma dos Açores para a questão deverá ser levada a cabo para que se possa vir a determinar a real prevalência deste parasita nos animais abatidos nos Açores.

4. Bibliografia

- Afonso MBVO, (2008) *Prevalência de Taenia saginata/ Cysticercus bovis na Região Autónoma da Madeira*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária
- Albuquerque GR, Munhoz AD, Flausino W, Silva RT, Almeida CRR, Medeiros SM, Lopes CWG. (2005) *Prevalência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em bovinos leiteiros do vale do Paraíba Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro*. Rev Bras Parasitol Vet14:125–128
- Arness MK, Brown JD, Dubey JP, Neafie RC, e Granstrom DE. (1999a) *An outbreak of acute eosinophilic myositis due to human Sarcocystis parasitism*. Am. J. Trop Med Hyg 1: 548-553
- Arness MK, Brown JD, Dubey JP. (1999b) *An outbreak of acute eosinophilic myositis attributed to huma Sarcocystis parasitism*. Am J Trop Med Hyg. 61: 548-53
- Audicana MT, Kennedy MW. (2008) *Anisakis simplex: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity*. Clin Microbiol Rev. 21(2): 360-379
- Azevedo EB. (2001) *Condicionantes Dinâmicas do Clima do Arquipélago dos Açores*. Boletim da Sociedade de Estudos Açoreanos “Afonso Chaves”. 9 (3): 309-317
- Banerjee PS, Bhatia BB, Pandit BA. (1994) *Sarcocystis sui hominis infection in human beingsi India*. J Vet Parasitol 8: 57-8
- Beaver PC, Gadgil RK, Morera P. (1979) *Sarcocystis in man: a review and report of five cases*. Am J Trop Med Hyg. 28: 819-44
- Bellani L, Mantovani A, Pampiglione S, Filippini I. (1978) *Observations on na outbreak of human trichinellosis in Northern Italy*. In: Kim CW, Pawlowski ZS, eds. *Trichinellosis*. Hanover, New Hampshire: University Press of New England. 557- 62
- Biering-Sorensen U. (1977) *Quoted in: Kyvsgaard NC, Ilsoe B, Henriksen SA, Nansen P. (1999) Distribution of Taenia saginata cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance for routine meat inspection*. Res. Vet. Sci. 49: 29-33

- Bommer W, Kaiser H, Mergerian H, Pottkammer G. (1980) An outbreak of trichinellosis in a youth center in northern Germany caused by imported air-dried camel meat. Abstracts of the 4th Int Cong of Trop Med and Malaria, Manila. 156
- Boone I, Thys E, Marcotty T, de Borchgrave J, Ducheyne E, Dorny P. (2007) *Distribution and risk factors of bovine cysticercosis in Belgian dairy and mixed herds*. Preventive Vet Med 82: 1-11
- Bowman DD. (1995) *Parasitology for Veterinarians*. 6^a Ed.; W. B. Saunders Company.
- Brandt JRA, Geerts S, De Deken R, Kumar V, Ceulemans F, Brijs L, Falla N. (1992) *A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory secretory antigens in Taenia saginata cysticercosis*. Intern. J. Parasitol 22: 471-477
- Bunyaratvej S, Bunyawongwiroj P, Nitiyanant P. (1982) *Human intestinal sarcosporidiosis: report of six cases*. Am J Trop Med Hy. 31: 36-41
- Cabaret J, Geerts S, Madeline M, Ballandonne C, Barbier D. (2002) *The use of urban sewage sludge on pastures: the cysticercosis threat*. Vet Res 33: 575-597
- Carvalho SP. (1991) *Sarcocistiose nos animais domésticos e no homem*. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. FMV-Universidade Técnica de Lisboa
- CCFRA (Campden & Chorleywood Food Research Association). (2000) *An Introduction to the Practice of Microbiological Risk Assessment for Food Industry Applications*. CCFRA Guideline No 28 (P. Voysey (ed)).
- Chai JY, Darwin Murrell K, Lymbery AJ. (2005) *Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues*. Int J Parasitol 35(11-12): 1233-54
- Chhabra MB, Samantaray S. (2013) *Sarcocystis and sarcocystosis in India: status and emerging perspectives*. J Parasitol Dis 37(1):1-10
- Chiesa F, Muratore E, Dalmaso A, Civera T. (2013) *A new molecular approach to assess the occurrence of Sarcocystis spp. in cattle and products thereof: preliminary data*. Italian J of Food Safety. 2: 41

- Costa GH, da Costa AJ, Lopes WD, Bresciani KD, dos Santos TR, Esper CR, Santana AE. (2011) *Toxoplasma gondii*: infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. *Exp Parasitol* 127: 277-281
- Croft JC. (1994) *Nonamebic protozoal enteridities*. In D. Hoeprich, M. C. Jordan, and A.R. Ronald (ed.) *Infectious processes*, 5th ed. Lippincott, Philadelphia, Pa. p. 769-774
- Daguer H, Vicente RT, Costa T, Virmond MP, Hamann W, Amendoeira MRR. (2004) *Soroprevalência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil*. *Cienc Rural* 34: 1133-1137
- Despacho n.º 14535-A/2013 - Diário da República, 2.ª série — N.º 218 — 11 de novembro de 2013
- Devine R. (2003) *La consommation des produits carnés*. *INRA Productions Animales*. 16: 325-327
- Domenis L, Peletto S, Sacchi L, Clementi E, Genchi M, Felisari L, Felisari C, Mo P, Modesto P, Zuccon F, Campanella C, Maurella C, Guidetti C, Acutis PL. (2011) *Detection of a morphogenetically novel Sarcocystis hominis-like in the context of a prevalence study in semi-intensively bred cattle in Italy*. *Parasitol Res* 109: 1677–1687
- Dorny P, Vercammen F, Brandt J, Vanteenkiste W, Berkvens D, Geerts S. (2000) *Sero-epidemiological study of Taenia saginata cysticercosis in Belgian cattle*. *Vet Parasitol* 88: 43-49
- Dubey JP, Speer CA, Charleston WAG. (1989a) *Ultrastructural differentiation between sarcocysts of Sarcocystis hirsuta and Sarcocystis hominis*. *Vet Parasitol* 34: 153-157
- Dubey JP, Speer CA, Fayer R. (1989b) *Sarcocystosis of animals and man*. CRC Press Boca Raton (FL), USA 167
- Dubey JP, Chapman JL, Rosenthal BM. (2006) *Clinical Sarcocystis neurana, Toxoplasma gondii, and Neospora caninum infections in dogs*. *Vet Parasitol* 137: 36-49
- Dubey JP, Frenkel JK. (1972) *Cyst-induced toxoplasmosis in cats*. *J Protozool*. 19:155–77

- Dubey JP, Hill DE, Jones JL. (2005) *Prevalence of viable Toxoplasma gondii in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers*. J Parasitol 91: 1082-93
- Dubey JP, Jones JL. (2008) *Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States*. Int J Parasitol 38:1257–1278
- Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJA. (2001) *A review of Sarcocystis neurona and equine protozoal myeloencephalitis (EPM)*. Vet Parasitol 95: 89-131
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. (1998) *Structure of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts*. Clin Microbiol Ver 11: 267–99
- Dubey JP, Lindsay DS. (2006) *Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants*. Vet Clin Food Anim 22: 645-671
- Dubey JP, Thulliez P. (1993) *Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed Toxoplasma gondii oocysts*. J Am Vet Res 54:270–273
- Dubey JP, Udtujan RM, Cannon L. (1990) *Condemnation of beef because of Sarcocystis hirsuta infection*. J Am Vet Med Assoc 196: 1095-6
- Dubey JP. (1986) *A review of toxoplasmosis in cattle*. Vet Parasitol 22: 177–202
- Dubey JP. (2005) *Sarcocystis*. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH (Eds). *Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections. Parasitology*. (p: 443-50) London: Hodder Arnod.
- Dubey JP. (2006) *Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of Toxoplasma gondii for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts*. Vet Parasitol 140:69–75
- Dubey JP. (2010) *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. Boca Raton, New York, USA 452

- EFSA (European Food Safety Authority) (2004) *Risk assessment of a revised inspection of slaughter animals in areas with low prevalence of Cysticercus* The EFSA Journal 176: 1-24
- Enigk K, Stoye M, Zimmer E. (1969) *The survival of Taenia eggs in silage*. Deutsche tierärztliche Wochenschrift. 76:421-425
- Engelbrecht H, Mentzel U. (1984) *Der urbane Wirtswechselzyklus von Taenia saginata in Kreis Wittstock, Bezirk Potsdam, Agnew*. Parasitol 25: 126-132
- EC (European Community) (2000) HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL: *Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on The control of taeniosis/cysticercosis in man and animals*. HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL
- Fajardo HV, D'ávila S, Bastos RR, Cyrino CD, Detoni ML, Garcia JL, Neves LB, Nicolau JL, Amendoeira MRR. (2013) *Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil*. Parasites & Vectors 6: 191-199
- Fayer R, e Johnson AJ. (1975) *Effect of amprolium on acute sarcocystosis in experimentally infected calves*. J Parasitol 61: 932-936
- Fayer R. (2004) *Sarcocystis spp. in Human Infections*. Clinical Microbiology Reviews 4: 894-902
- Ferrer E, Benitez L, Foster-Cuevas M, Bryce D, Wamae LW, Onyango-Abuje JA, Garate T, Harrison LJ, Parkhouse RM. (2003) *Taenia saginata derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis*. Vet Parasitol 111(1): 83-94
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/ World Health Organization) (2014) *Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Meeting, 3–7 September 2012, FAO Headquarters, Rome, Italy 77
- Fonseca J, Spínola T (2000) *A Cisticercose Bovina identificada na Região Autónoma da Madeira* Revista O Med Vet 65
- França Dória JC. (2011) *A Evolução da Cisticercose na Região Autónoma da Madeira entre 2005 e 2010*. http://www.vetbiblios.pt/ARTIGOS_TECNICOS/Artigos_Tecnicos.htm (acedido a 15-06-2014)

- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Sci* 167:893–6
- Gamble HR, Murrell KD. (1998) *Diagnosis of parasites in food*. In: Smith HV, Stimson WH, editors. Chappel LH, co-ordinating editor. *Infectious diseases diagnosis: current status and future trends*. *Parasitol* 117: 97-112
- Geerts S, Kumar V, Ceulemans F, Mortelmans J. (1981) *Serodiagnosis of Taenia saginata cysticercosis in experimentally and naturally infected cattle by enzyme-linked immunosorbent assay*. *Res Vet Sci* 30: 288-293
- Geerts S, Kumar V, van den Abbeele. (1980) *Taenia saginata cysticercosis in slaughter cattle in Belgium*. *VI. Diergeneesk. Tijdschr* 49: 365-374
- Gemmell M, Matyas Z, Pawlowski Z, Soulsby E.J.L. (1983) *Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of Taeniasis/Cysticercosis*. World Health Organization, Geneva, Switzerland: VPH/83. 49: 207pp
- Giroto A, Pinto PSA, Dias JCO, Chaves LSC, Rerreira HCC. (2009) *Detecção de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina o immunoblot*. *Ciência Rural* 39(4): 1147-1151
- Gonzalez LM, Villalobos N, Montero E, Morales J, Álamo Sanz R, Muro A, Harrison LJS, Parkhouse RME, Gárate T. (2006) *Differential molecular identification of Taeniid spp. and Sarcocystis spp. cysts isolated from infected pigs and cattle*. *Vet Parasitol* 142: 95-101
- Gracey JF. (1986) *Meat Hygiene*. 8ª ed.: Bailliere Tindall London, UK 748
- Guilhon J. (1977) *Origine des recentes epidémies de trichinose humaine observees en France*. *Bull Acad Natl Med (Paris)*. 161: 174-178
- Hadjuk F, Muller KH, Saalbreiter R, Eymmer HJ, Hiepe T, Bruckner B, Wilhelm W. (1969) *Occurrence, spread and fight against taeniasis and cysticercosis*. *Z. für ärztliche Fortbildung* 63: 1146-1152

- Hall A, Latham MC, Crompton DW, Stephenson LS. (1981) *Taenia saginata* (Cestoda) in western Kenya: the reliability of faecal examinations in diagnosis. Parasitol 83 1: 91-101
- Harrison LJ, Garate T, Bryce DM, Gonzalez LM, Foster-Cuevas M, Wamae LW, Onyango-Abuje JA, Parkhouse RM. (2005) Ag-ELISA and PCR for monitoring the vaccination of cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncospherical adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization. Trop Anim Health Prod 37(2): 103-120
- Harrison LJ, Parkhouse RM. (1989) *Taenia saginata* and *Taenia solium*: reciprocal models. Acta Leiden 57(2): 143-152
- Harrison LJS, Joshua G, Wright S, Parkhouse R. (1989) Specific detection of circulating surface secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. Parasite Immun 11: 351-380
- Heydorn AO. (1977) Sarkosporidien infiziertes Fleisch als mögliche Krankheitsursache für den Menschen. Arch. Lebensmittelhyg 28: 27-31
- Hochberg NS, Hamer DH. (2010) Anisakidosis: Perils of the deep. Clin Infect Dis 51(7):806-12
- Holec-Gąsior L, Drapała D, Dominiak-Górski B, Kur J. (2013) Epidemiological study of *Toxoplasma gondii* infection among cattle in Northern Poland. Annals of Agricultural and Environmental Med Vol 20, No 4, 653–656
- Ilsoe B, Kyvsgaard NC, Nansen P, Henriksen SA. (1990) A study on survival of *Taenia saginata* eggs on soil in Denmark. Act Vet Scand 31: 153-158
- Imes GD, Migaki G. (1967) Eosinophilic myositis in cattle-pathology and incidence. In: Proceedings of the 71st Annual Meeting of US (p: 111-2) Livestock Sanitary Association
- INE (Instituto Nacional de Estatística) (2009) Recenseamento Agrícola, http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=119564579&PUBLICACOESmodo=2 (acedido a 19-03-2013)

- Inpankaew T, Pinyopanuwut N, Chimnoi W, Kengradomkit C, Sununta C, Zhang G, Nishikawa Y, Igarashi I, Xuan X, Jittapalapong S. (2010) *Serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection in dairy cows in Thailand*. *Transbound Emerg Dis* 57: 42-45
- Jepsen A, Roth H. (1949) *Epizootiology of Cysticercus bovis - resistance of the eggs of Taenia saginata*. *Report of the 14 International Vet Congress* 2: 43-50
- Kawazoe U. (2005) *Toxoplasma gondii*. In: Neves D.P. (Ed.) *Parasitologia Humana*. 11.ed.: Atheneu São Paulo, Bras 494
- Kyvsgaard N, Ilsoe B, Henriksen SA, Feld NC, Nansen P. (1991b) *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Taenia saginata cysticercosis in cattle*. *Act Vet Scand* 32(2): 233-41
- Kyvsgaard NC, Ilsoe B, Henriksen SA, Nansen P. (1990) *Distribution of Taenia saginata cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance for routine meat inspection*. *Res Vet Sci* 49(1): 29-33
- Kyvsgaard NC, Ilsoe B, Willeberg P, Nansen P, Henriksen SA. (1991a) *A casecontrol study of risk factors in light Taenia saginata cysticercosis in Danish cattle*. *Act Vet Scand* 32: 243-252
- Leek RG, e Fayer R. (1978) *Infectivity of Sarcocystis in beef and beef products from a retail food store*. *Proc Helminthol Soc Wash* 45: 135-136
- Leek RG, e Fayer R. (1980) *Amprolium for prophylaxis of ovine Sarcocystis*. *J Parasitol* 66: 100-106
- Leek RG, e Fayer R. (1983) *Experimental Sarcocystis ovicanis infection in lambs: salinomycin chemoprophylaxis and protective immunity*. *J Parasito.* 69: 271-276
- Lees W, Nightingale J, Brown D, Scandratt B, Gajadhar A. (2002) *Cysticercus bovis (Taenia saginata) in feedlot cattle in Alberta*. *Canad Vet J* 43: 227-228
- LRVA (Laboratório Regional de Veterinária dos Açores) (2009) *PT53-corte ao micrótopo*. edição 1

- LRVA (Laboratório Regional de Veterinária dos Açores) (2014) *ITPar03 coloração Hematoxilina Eosina*. edição 1
- Lucker S, Douvres C. (1960) *Survival of Taenia saginata eggs on stored hay*. Proceedings of the Helminthological Society 27: 110-111
- Maia CC. (1949) *Parasitismo humano por "Strongyloides Stercoralis" em território português. (Notas sobre 54 casos autóctones da Metrópole)*. Separata do J do Med, Volume XIV 339: 91-101
- Maia CC. (1950) *A Distomatose hepática nos gados da Ilha da Madeira*. Separatado Boletim de Informação e Publicidade, Junta dos Lacticínios da Madeira.
- Maia CC. (1952) *Aspectos tropicais da patologia madeirense (Parasitoses intestinais: incidência e endemicidade)*. Separata dos Anais do Instituto de Med Trop, Volume IX, n.º 4, Dezembro.
- Maia CC. (1953) *Sobre as parasitoses intestinais humanas da ilha da Madeira e especialmente a Ancilostomíase; Aspectos epidemiológicos, Importância económica, Medidas profiláticas*. Separata do Boletim Distrital. 5, Maio, Junta, Geral do Distrito Autónomo do Funchal. Tipografia J da Madeira, Funchal.
- Markus MB, van der Lugt JJ, Dubey JP. (2004) *Sarcocystis*. In: Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC, (Eds.) *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa*. (p: 360-75) Ni City (South Africa): Oxford Univ Press Southern Africa.
- McCool CJ. (1979) *Distribution of Cysticercus bovis in lightly infected young cattle*. Australian Vet J 55: 214-216
- Meiry M, Brenner G, Markovits A, Klement E. (2012) *A Change in the Epidemiology of Bovine Cysticercosis in Israel Between 1973 and 2008 Due to Import of Live Cattle*. Transboundary and Emerging Dis 60: 298-302
- Menezes RCAA, Lopes CWG. (1995) *Epizootiologia da Eimeria arloingi em caprinos na microrregião serrana-fluminense, Rio de Janeiro, Brasil*. Revta Univ. Rural, Ser Ciên Vida 17: 5-12

Mensa J, Gatell JM, Jimenez de Anta, Prats G. (1999) *Guia e terapeutica antimicrobiana*. 9th ed. Masson, S. A., Barcelona, Spain.

Minozzo JC, Gusso RLF, Castro EA, Lago O, Soccol VT. (2002) *Experimental bovine infection with Taenia saginata eggs: recovery rate and cysticerci location*. Brazilian Archives of Biology and Technology. 4: 451-455

Minozzo JC, Soccol VT, Olortegui CC, Soares VE, Costa AJ. (2004) *Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra Cysticercus bovis*. Ciên Rural 34(3): 1-12.

Monteiro LL, Pinto PSA, Dias FS. (2006) *Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with Cysticercus bovis*. Vet Parasitol 141: 260-263.

Moré G, Pantchev A, Skuballa J, Langenmayer MC, Maksimov P, Conraths FJ, Venturini MC, Schares G. (2014) *Sarcocystis sinensis is the most prevalent thick-walled Sarcocystis species in beef on sale for consumers in Germany* Parasitol Res

Morris DL, Hughes DL, Hewitt RJ, Norrington IJ. (1986) *Pathogens in sewage sludge: (ii) effects of stabilization and treatment processes on viability and infectivity of beef tapeworm eggs*. Water Pollut Control 85: 476-481.

Motyka S. (1976) *Enquete epidemiologique a propos d'un foyer de trichinose humaine dans la region parisienne*. Bull Acad Vet Fr 49: 95-99.

Munday BL, Corbould A. (1979) *Serological responses of sheep and cattle exposed to natural Toxoplasma infection*. Aust J Exp Biol Med Sci 57: 141-145.

Nicolle C, Manceaux L. (1909) *Sur une protozoaire nouveau du gondii, Toxoplasma*. Archives de L'institut Pasteur de Tunis 2: 216-218.

Nunes CM, Lima LGF, Manoel CS, Pereira RN, Nakano MM, Garcia JF. (2003) *Taenia saginata: polymerase chain reaction for taeniasis diagnosis in human faecal samples*. Experimental Parasitol 104: 67-69.

- Ogawa L, Freire RL, Vidotto O, Gondim LFP, Navarro IT. (2005) *Occurrence of antibodies to Neospora caninum and Toxoplasma gondii in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil*. Arq Bras Med Vet Zootec 57: 312-316.
- OIE (Office Internationale des Epizooties) Manual, 2008/Regulation (EC) N° 854/2004
- Olsen OW. (1979) *Parasitologia Animal – Platelminhos, Acantocefalos y Nematelmintos*. Vol. II, 1ª Ed, Ed AEDOS, Barcelona, Espanha. 504-505.
- Onyango-Abuge JA, Hughes G, Opicha M, Nginyi KM, Rugutt MK, Wright SH, Harrison LJ. (1996) *Diagnosis of Taenia saginata cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA*. Vet Parasitol 61: 221-230.
- Paulan SC, Gonzáles MRH, Peralta LA, Vicentini-Oliveira JC, Biondi GF, Conde ES, Parkhouse RME, Nunes CM. (2013) *Usefulness of serological ELISA assay for Taenia saginata to detect naturally infected bovines* Rev Bras Parasitol Vet, Jaboticabal. 22: 270-275.
- Pawlowski ZS. (2005) *Role of chemotherapy of taeniasis in prevention of neurocysticercosis*. Parasitol Int. 55: 105-109.
- Pike EB. (1986) *UK research on incidence, transmission and control of Salmonella and parasitic ova in sludge*, in: Block JC, Havelaar AH, L'Hermite P (Eds), *Epidemiological studies of risks associated with agricultural use sewage sludge: knowledge and needs*. (pp. 50-59) Elsevier Applied Sci Publishers, London, UK.
- Pivato IM. (1986) *Ocorrência de Sarcocystis sp (LANKESTER, 1882) em bovinos clinicamente sadios abatidos em Pelotas*. RS. 23.
- Pozio E. (1998) *Trichinellosis in the European Union: Epidemiology, Ecology and Economic Impact*. Parasitol Today 14: 35-38.
- Pozio E. (2001) *New patterns of Trichinella infection*. Vet Parasitol 98: 133-148.
- Pritt B, Trainer T, Simmons-Arnold L, Evans M, Dunams D, Rosenthal BM. (2008) *Detection of Sarcocystis parasites in retail beef: a regional survey combining histological and genetic detection methods*. J of Food Protection. 71(10): 2144-2147.

- Queiroz RPV, Santos WLM, Barbosa HV, Souza RM, Filho AMPS. (2000) *A Importancia do Diagnóstico da Cisticercose Bovina*. Hig Alimentar 11(77): 12-15.
- Quinet G. (1987) *Trichinellose humaine: etude epidemiologique des deux endemies observes en France en 1985*. Rev Sci Tech Off Int Epizootiol 6: 219-224.
- Regulamento (CE) Nº 617/2003, DA COMISSÃO, de 4 de Abril. J Oficial da União Europeia.
- Regulamento (CE) Nº 854/2004, DA COMISSÃO, de 29 de Abril. J Oficial da União Europeia.
- Regulamento (CE) Nº 2075/2005, DA COMISSÃO, de 5 de Dezembro. J Oficial da União Europeia.
- Ruas JL, Cunha CW, Silva SS. (2001) *Prevalência de Sarcocystis spp. (Lankester, 1882) em bovinos clinicamente sadios, da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil*. Rev Bras de Agrociência 7(3): 227-230.
- Saleque AP, Juyal D, Bhatia BB. (1990) *Effect of temperature on the infectivity of Sarcocystis meischeriana cysts in pork*. Vet Parasitol 36: 343-346.
- Sanati H, Nourollahi Fard SRN, Nahrevanian H, Khalili M, Safari Z. (2012) *Seroprevalence of Toxoplasma gondii Antibodies in Dairy Cows in Kerman Province, South East Iran* Curr Res J of Biol Sci 4(4): 417-421.
- Santos FMMP, Bastos JG, Almeida VCT. (1991) *Contribuição ao estudo da cisticercose bovina na Região Autónoma da Madeira*. O Med Vet 24: 35-45.
- SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health) (2000) *Opinion on the control of taeniosis/cysticercosis in man and animals, adopted on 27–28 September*. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out36_en.pdf (acedido a 18-08-2013)
- SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health) (2003) *Opinion on revision of meat inspection in veal calves, adopted on 14–15 April*. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out65_en.pdf (acedido a 18-08-2013)

- Senaud J. (1967) *Contribution a l'etude des sarcosporidies et des toxoplasmes Toxoplasma*. *Protistologica* 3: 169-232.
- Solanki PK, Shrivastava HOP, Shah HL. (1976) *Morphology of sarcocysts of Sarcocystis miescheriana* (Khun, 1865; Labbe, 1899) and *Sarcocystis suihominis* (Tadros and Laarman, 1976; Heydorn, 1977) from naturally infected domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) in India. *Indian J Anim Sci* 61: 1030-3.
- Soulsby E.J.L. (1965) *Textbook of Veterinary Clinical Parasitology. I (Helminths)* Ed. Elackwell London, UK. 1120.
- Sousa F, Fragata A. (2004) *A carne de bovino dos Açores – vias para o seu desenvolvimento*. *Agronomia Lusitana* 51 (3): 181-218 .
- Spagnol FH, Paranhos EB, Oliveira LLS, Medeiros SM, Lopes CWG, Albuquerque GR. (2009) *Prevalência de anticorpos anti- Toxoplasma gondii em bovinos abatidos em matadouros do estado da Bahia, Brasil*. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 42-45.
- Speer CA, Dubey JP. (2005) *Ultrastructural differentiation of Toxoplasma gondii schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites*. *Int J Parasitol* 35: 193–206.
- Splendore A. (1908) *Um nuovo protozoo parassita de' conigli – incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo*. *Rev da Sociedade de Sci* 3: 109-112.
- Taylor MA, Boes J, Boireau P, Boué F, Claes M, Cook AJC, Dorny P, Enemark H, Howell JM, Kirjušina M, Nöckler K, Giessen, Hunt KR, Pozio E, Rossi P, Snow L, Theodoropoulos G, Vallée I, Vieira-Pinto MM, Zimmer IA. (2010) *Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Sarcocystis in animals and foodstuffs in the European Union* SCIENTIFIC REPORT submitted to EFSA.
- Tenter AM. (1995) *Current research on Sarcocystis species of domestic animals*. *Int J Parasitol* 25: 1311-30.
- Tenter AM. (2009) *Toxoplasma gondii in animals used for human consumption*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 364-369.

- Urquhart GM, Armour J, Duncan, JL, Dunn AM, Jennings FW. (1998) *Parasitologia Veterinária*. 2. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogen 106-108.
- van den Enden E, Praet M, Joos R, Van Gompel A, Gigasse P. (1995) *Eosinophilic myositis resulting from sarcocystosis*. J Trop Med Hyg. 98(4):273-6.
- van Knapen F, Buys J. (1985) *Tapeworms in the Netherlands*. Tijdschr Diergeneeskd 110: 761-770.
- Vangeel L, Houf K, Chiers K, Vercruyse J, D'Herde K, Ducatelle R. (2007) *Molecular-Based Identification of Sarcocystis hominis in Belgian Minced Beef*. J of Food Protection 70 (6): 1523-1526.
- Villeneuve A. (2001) *Under the Microscope: Zoonotic Parasites in Meat* Canadian Meat Science Association. December 3-6.
- Vinueza C, Gallegos C, Barrionuevo M, Celi M, Benitez W. (2001) *Inmunodiagnostico de cysticercus bovis en el camal frigorífico municipal de riobamba (cfmr) por medio de la técnica ELISA-ag*. INTERNATIOAL WORKSHOP ON TENIASIS AND CISTICERCOSIS. 19 a 21 de Setembro de 2001. Quito – Ecuador.
- Walther M, Koske JK. (1980) *Taenia saginata cysticercosis: a comparison of routine meat inspection and carcass dissection results in calves*. Vet Rec 106: 401-402.
- Wang Q, Jiang W, Chen YJ, Liu CY, Shi JI, Li X. (2012) *Prevalence of Toxoplasma gondii antibodies, circulating antigens and DNA in stray cats in Shanghai, China*. Parasites & Vectors 5:190.
- Wanzala W, Onyango-Abuji JA, Kangethe EK, Ochanda H, Harrison LJ. (2002) *Serodiagnosis of bovine cysticercosis by detecting live Taenia saginata cysts using a monoclonal antibody-based antigen ELISA*. J South Africa Vet Assoc 73: 201-206.
- WHO (World Health Organisation). (1984) *The role of food safety in health and development*. WHO Technical Reports. No. 705. World Health Organisation, Geneva, Switzerland.

Wouda W, Snoep JJ, Dubey JP. (2006) *Eosinophilic myositis due to Sarcocystis hominis in beef cow*. J Comp Pathol 135(4): 249-53.

Zhou D, Zhao F, Lu P, Xia H, Xu M, Yuan L, Yan C, Huang S, Li S, Zhu X. (2012) *Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in dairy cattle in southern China*. Parasites & Vectors 5:48.