

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE *Echinococcus granulosus sensu lato* EM
SUÍNOS NO RIO GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Danieli Urach Monteiro

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE *Echinococcus granulosus sensu lato* EM SUÍNOS
NO RIO GRANDE DO SUL**

Danieli Urach Monteiro

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Mário Luiz de la Rue

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Echinococcus granulosus sensu lato EM SUÍNOS NO RIO GRANDE
DO SUL**

elaborada por
Danieli Urach Monteiro

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Mário Luiz de la Rue, Drº.
(Presidente/Orientador)

Daniel A S Graichen, Drº. (UFSM)

Aleksandro Schafer da Silva, Drº. (UDESC)

Santa Maria, 01 de março de 2013.

*Dedico este trabalho
ao meu orientador, Mário,
pela confiança,
e a minha mãe, Zélia
pela incansável dedicação e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, mostrar os caminhos nas horas incertas e me dar forças para seguir sempre em frente.

A minha mãe, meu exemplo de sabedoria e dedicação, meu muito obrigada, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pelo incentivo e por todo amor.

A meu orientador Prof Dr. Mário Luiz de la Rue, pelo apoio, motivação e em especial pela sabedoria compartilhada. Meus sinceros agradecimentos.

A prof.Dr. Sônia de Ávila Botton, pela amizade, infinita disponibilidade e por todos os ensinamentos na condução deste meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade em receber o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, em especial ao funcionário Paulo Ricardo pelo seu auxílio e disponibilidade oferecida.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos professores Dr. Daniel Ângelo S. Graichen e Drº. Aleksandro Schafer da Silva, que aceitaram compor a comissão examinadora, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

Agradeço de forma especial à Isabel Azevedo, amiga fiel, companheira e incentivadora em todos os momentos. “Miga” te admiro muito!

Aos meus colegas de laboratório, meu muito obrigado, especialmente a Camila, Tatiana, Vanessa, Louise, Carla e Charlise, pela amizade, companheirismo, incentivo e por sempre estarem ao meu lado. Agradeço também ao Alexandre, amigo querido, pela incrível disponibilidade oferecida. Vocês foram simplesmente essenciais.

Obrigada Marília, pelo amor e cumplicidade e por estar ao meu lado sempre.

Ao, Robson, meu companheiro nesta trajetória, agradeço todo o seu amor, carinho, incentivo e pela presença incansável com que me apoiou ao longo do período de elaboração desta dissertação. A vitória é nossa!

A todos os amigos do coração, em especial a Thiele e Edith, pela cumplicidade, incentivo, conversas, cuidado, sempre me impulsionando a ser uma pessoa melhor.

“O maior ativo que alguém pode ter, são pessoas que acreditam em sua capacidade.”

"O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar
e de correr o risco de viver seus sonhos."

Paulo Coelho

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Echinococcus granulosus sensu lato* EM SUINOS NO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: DANIELI URACH MONTEIRO
ORIENTADORA: MÁRIO LUIZ DE LA RUE

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 01 de março de 2013.

Equinococose é uma infecção zoonótica causada por um metacestóide pertencente à família Taeniidae e gênero *Echinococcus*. O estágio larvário (cisto hidático) do parasito causa sérios problemas de saúde pública, além de atingir várias espécies de animais, acarretando prejuízos econômicos à indústria de carnes. A equinococose é considerada endêmica em alguns países, sendo que na América do Sul os países mais acometidos são Argentina, Uruguai, Peru, Bolívia, Chile e parte sul do Brasil. No Rio Grande do Sul (RS), principalmente em regiões de fronteira com Argentina e Uruguai, há uma ocorrência maior de casos, acometendo preferencialmente ovinos e bovinos, sendo que a espécie prevalente no estado é o *Echinococcus granulosus*. O controle do parasito deve ser baseado no adequado conhecimento do ciclo de transmissão e de sua taxonomia, sendo essencial à vigilância epidemiológica preditiva. A identificação da espécie e cepas dentro do gênero *Echinococcus*, assim como o reconhecimento de áreas geográficas contaminadas pelo parasito é essencial para o estabelecimento de programas de controle da equinococose. As ferramentas moleculares são utilizadas na identificação e caracterização deste parasito com rapidez, eficácia e segurança, favorecendo um diagnóstico preciso desta enfermidade. Diante da importância de dados epidemiológicos acerca da equinococose cística no estado de RS, este estudo teve como objetivo, realizar a identificação e a caracterização molecular de cistos em vísceras suínas, a fim de localizar possíveis focos da equinococose cística em propriedades rurais na região centro/norte do Rio Grande do Sul, bem como caracterizar a espécie e cepa presente nos cistos hidáticos. Neste trabalho foram analisadas vísceras suínas oriundas de frigoríficos da região centro/norte do RS. Um total de 3.101.992 suínos foram abatidos na região estudada no período de janeiro de 2008 a 2012, destes, 58 animais continham cistos, apresentando morfologia compatível com cisto hidático. Foram realizadas análises macroscópicas e moleculares em todos os cistos encontrados. Para a realização da PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizou-se um fragmento do gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I (cox-I)*. Análise macroscópica constatou cistos de formas e tamanhos variados. Na caracterização molecular, evidenciou-se *Echinococcus* spp. (10,3%), *Taenia hydatigena* (56,9%) e inconclusivos (32,8%). Para análise molecular empregou-se o método de *Neighbor-Joining*, onde identificou-se dois grupos distintos caracterizados dentro da espécie *Echinococcus granulosus sensu lato*. O *E. granulosus stricto sensu* cepa G1 foi identificado em 2 amostras e *E. canadensis* cepa G7 em 3 amostras. Os resultados evidenciam o papel epidemiológico dos suínos, atuando como hospedeiro intermediário de *Echinococcus granulosus sensu lato* e seu potencial na transmissão de cepas infectantes para humanos no sul do Brasil. Desta forma é necessário uma monitorização constante e rigorosa identificação de cistos, evitando resultados não fidedignos, a fim de monitorar a propagação da equinococose cística no estado do RS.

Palavras-chave: *Echinococcus* spp., *Taenia hydatigena*. Rio Grande do Sul. Suínos.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Echinococcus granulosus sensu lato* IN SWINES OF RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: DANIELI URACH MONTEIRO

ADVISER: MÁRIO LUIZ DE LA RUE

Day and Place of the Defense: Santa Maria, March 01st, 2013.

Echinococcosis is a zoonotic infection caused by a metacestóide belonging to the family Taeniidae genus *Echinococcus*. The larval stage (hydatid cyst) of the parasite causes serious public health problems, and achieves several species of animals, including livestock production, leading to economic losses to the meat industry. Echinococcosis is considered endemic in many countries and in South America the most affected countries are Argentina, Uruguay, Peru, Bolivia, Chile and southern part of Brazil. In the State of Rio Grande do Sul (RS), especially border regions with Argentina and Uruguay, there is a higher prevalence of cases affecting mainly sheep and cattle, consisting *Echinococcus granulosus* the most prevalent specie. The parasite control should be based on adequate knowledge of the transmission cycle and taxonomy of the parasite. It is essential to predictive epidemiological surveillance, in cases of disease, the determination of appropriate treatment actions. The identification of species and strains within the genus, as well as recognition of the geographical area infested by the parasite is essential for the establishment of programs to control equinococosis. Molecular tools are used in the identification and characterization of this parasite due to be quick, efficient and safe techniques, favoring an accurate diagnosis of the disease and assisting in the development of control programs, as well as in the prevention of cystic echinococcosis. Given the importance of epidemiological data of cystic echinococcosis in the state of RS, this study aimed to perform the identification and molecular characterization of cysts in swine viscera, in order to identify sources of cystic echinococcosis in rural properties belonging to the central / north areas of Rio Grande do Sul, as well as characterize the species and strains present in the hydatid cysts evaluated. For that, the present work analyzed viscera of swines from a slaughterhouse located in the central/north region of RS. A total of 3,101,992 swines were slaughtered from January 2008 to January 2012 in its facilities. Of these, 58 animals presented cysts, which had morphology compatible with hydatid cyst. Molecular and macroscopic analyses of the cysts were carried out. To perform the PCR (polymerase chain reaction), a gene fragment of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COX-I) was used. Macroscopic analysis showed cysts of varying sizes and shapes. Molecular characterization showed up: *Echinococcus* spp. (10.3%), *Taenia hydatigena* (56.9%) and inconclusive (32.8%). For molecular analysis, the neighbor-joining method was used, which identified two distinct groups characterized within species *Echinococcus granulosus sensu lato*. *E. granulosus sensu stricto* G1 strain was identified in 2 samples and *E. canadensis* strain G7 in 3 samples. With this results stands out the epidemiological role of swines, acting as an intermediate host of *Echinococcus* spp. and their potential for transmission of strains to humans in southern Brazil. Thus, it is necessary a constantly vigilance and an accurate identification of cysts, avoiding then, unreliable results, and allowing to follow up the spread of cystic echinococcosis in the State of RS.

Keywords: *Echinococcus* spp.. *Taenia hydatigena*. Rio Grande do Sul. Swines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– A. <i>Echinococcus</i> spp. adulto; B. Ovo; C. Cisto hidático com vesículas prolíferas; (d-e: hidátide filhas e netas); D. Protoescólex invaginado; E. Protoescólex desinvaginado (presentes no interior do cisto hidático).....	18
Figura 2 – Ciclo biológico do <i>Echinococcus granulosus</i>	20
Figura 3 - Distribuição geográfica mundial de <i>Echinococcus granulosus sensu lato</i>	24
Figura 4 - Prevalência de equinococose cística humana em municípios da área endêmica do RS (/100.000 habitantes 1999).....	26

MANUSCRITO 1

Figure 1 - Map of Rio Grande do Sul, Brazil. The map emphasizes the municipalities in central/north region where are located the swine breeding farms in RS, corresponding the studied area.....	44
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

MANUSCRITO 2

Figura 1 - Neighbor Joining (NJ) tree based on <i>cytochrome c oxidase I gene (cox-I)</i> , for <i>Echinococcus</i> spp. isolates/genotypes. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA5.....	55
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CISPOA - Coordenadoria de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal

COX-I – Citocromo C Oxidase Subunidade I

DATASUS – Departamento de informática do SUS

EC - Equinococose cística

HD - Hospedeiro definitivo

HI - Hospedeiro intermediário

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RS - Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Morfologia	17
3.2 Ciclo Biológico	19
3.3 Taxonomia	20
3.4 Epidemiologia	23
3.5 Transmissão	25
3.6 Equinococose Cística	25
3.6.1 Em Humanos.....	25
3.6.2 Nos Animais	27
3.7 Tratamento	28
3.8 Controle e Profilaxia.....	29
3.9 Prejuízo à Industria de Carnes	30
3.10 Diagnóstico.....	30
3.11 Análise Molecular	31
4 RESULTADOS	34
MANUSCRITO 1 – A NOVEL EPIDEMIOLOGIC SITUATION IN SOUTHERN BRAZIL: FIRST REPORT OF <i>ECHINOCOCCUS</i> SPP. IN SWINE	34
Abstract	36
Introduction.....	36
Material and Methods.....	38
Results	38
Discussion	39
References	41
MANUSCRITO 2 – <i>ECHINOCOCCUS CANADENSIS</i> (G7) AND <i>ECHINOCOCCUS GRANULOSUS SENSU STRICTO</i> (G1) IN SWINES OF SOUTHERN BRAZIL	45
Abstract	47
Introduction.....	47
Material and Methods.....	48
Results	50
Discussion	50
References	52
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

Equinococose, também conhecida por hidatidose, é causada por um parasito pertencente à família Taeniidae e gênero *Echinococcus*. O *Echinococcus* spp. tem uma distribuição mundial e exerce vários danos à saúde pública além de perdas na indústria de carnes. Seu ciclo de vida compreende dois hospedeiros distintos, o definitivo (HD), sendo o principal o cão, que alberga o parasito adulto e o intermediário (HI), geralmente ovinos e bovinos que abriga a fase larvária (cisto hidático) (ECKERT et al., 2001; THOMPSON, 2008; MONTEIRO, 2011). Através da ingestão dos ovos do *Echinococcus* spp., juntamente com a alimentação e/ou água, ocorre a contaminação dos HI e acidentalmente, sendo da mesma forma a contaminação de humanos.

As quatro principais espécies de *Echinococcus*, tradicionalmente, reconhecidas incluem *Echinococcus multilocularis*, causador da equinococose alveolar; *Echinococcus oligarthrus* e *Echinococcus vogeli*, responsáveis pela equinococose policística e *Echinococcus granulosus*, agente etiológico da equinococose cística (EC). O *E. granulosus sensu lato* é tradicionalmente dividido em subespécies que abrangem 10 genótipos diferentes (G1 ao G10) com variações principalmente na morfologia, hospedeiro intermediário e infectabilidade (THOMPSON, 2008; SHARBATKHORI, 2009; GROSSO et al., 2012). Estes genótipos são descritos como: *E. granulosus sensu stricto* (G1, G2, G3), *E. equinus* (G4) e *E. ortleppi* (G5), além de *E. canadensis* (G6 ao G10), que possui uma taxonomia bastante controversa (NAKAO et al., 2007). Recentes estudos filogenéticos incluem mais duas espécies dentro do gênero *Echinococcus*, o *Echinococcus shiquicus*, causador do cisto unilocular e o *Echinococcus felidis*, oriundo de leões da África (NAKAO et al., 2007; THOMPSON, 2008).

A EC é uma parasitose comum no sul do Brasil, principalmente no RS, as regiões de fronteira com Argentina e Uruguai são as mais acometidas pela parasitose (ROSENZVIT et al., 1999; de la RUE, 2008). A migração do *E. granulosus* é favorecida pela intensa atividade pecuária, que é economicamente ativa no estado, acometendo principalmente ovinos e bovinos, que devido a criação

extensiva, facilita o acesso dos cães a estes animais (de la RUE, 2008; de la RUE et al., 2011).

Estudo feito, no RS, pelo Departamento de Produção Animal (DPA – Secretaria da Agricultura) entre 2001 e 2009, através de exame macroscópico das lesões, encontrou índices de prevalência de EC em animais sob Inspeção Sanitária de 1,87% em suínos, 25,20% em ovinos e 10,31% em bovinos, indicando uma alta prevalência do *Echinococcus* spp. entre os animais no estado (SANTOS et al., 2010).

O suíno está entre as espécies acometidas pelo *Echinococcus granulosus sensu lato*, especialmente devido à forma de criação intensiva, próxima às propriedades, o que pode facilitar a contaminação pelo parasito. A suinocultura é uma atividade importante para a economia do RS, sendo que no ano de 2012, registrou-se 7.034.228 abates de suínos no estado, um aumento de 4,40% relacionado com o ano de 2011, segundo dados do ACSURS (Associação de Criadores de Suínos do RS). Entretanto, observa-se, pelos dados dos Serviços de Inspeção Sanitária, tanto em nível federal como estadual, que ainda há uma série de enfermidades acometendo esses animais (SANTOS et al., 2010; ACSURS, 2012). A equinococose em suínos acarreta prejuízos à indústria de carnes, principalmente pelo descarte de vísceras, devido à ocorrência de contaminação durante o ciclo de produção animal. Além dos riscos inerentes à saúde pública, uma vez que muitos produtores desconhecem a doença, já que esta não é uma enfermidade considerada usual na suinocultura (SANTOS et al., 2010).

Em humanos o desenvolvimento do cisto hidático é geralmente lento e assintomático, dificultando o diagnóstico da enfermidade. No Brasil, a notificação desta parasitose em humanos não é obrigatória pelo Ministério da Saúde desde 1987, o que afeta o desenvolvimento de ações e informações sobre a epidemiologia acerca da equinococose (de la RUE et al., 2011).

Outro cestódeo presente no RS é *Taenia hydatigena*, que apesar de não ser infectante para seres humanos, traz prejuízos à indústria de carnes. Sua fase larvária é denominada de *Cysticercus tenuicollis*, muito semelhante ao cisto hidático desenvolvido pelo *E. granulosus*, o que pode originar erros de diagnóstico nas análises macroscópicas (CABRERA et al., 1995).

A identificação correta de cistos do *Echinococcus* spp. em frigoríficos é de extrema importância, assim como a determinação do genótipo específico em questão, a fim de reconhecer os eminentes riscos da EC para humanos e animais, bem como estabelecer tratamentos que condizem com o ciclo de vida do parasito. Os métodos moleculares são ferramentas tão importantes quanto os métodos parasitológicos e sorológicos convencionais de identificação deste parasito, em cisto hidáticos em animais, e vêm auxiliar no diagnóstico rápido e preciso da enfermidade (de la RUE et al., 2011; BALBINOTTI et al., 2012).

O conhecimento das possíveis regiões endêmicas da EC no RS é essencial para direcionar as ações de profilaxia e de controle da parasitose, que buscam interromper o ciclo do *Echinococcus* spp. evitando sua disseminação. Diante disto, motivou-se a realização deste trabalho, a fim de determinar novos aspectos sobre a epidemiologia desta zoonose no RS, bem como espécies e genótipos do *E. granulosus sensu lato*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

- Realizar a identificação e a caracterização molecular de cistos em vísceras suínas, a fim de localizar possíveis focos da equinococose cística em propriedades rurais na região centro/norte do Rio Grande do Sul, bem como caracterizar a espécie e cepa presente nos cistos hidáticos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o potencial da região centro/norte do RS como foco de desenvolvimento da equinococose cística;
- Identificar macroscopicamente cistos hidáticos em vísceras suínas;
- Caracterizar molecularmente amostras de cisto em vísceras suínas;
- Empregar técnicas moleculares para determinar os diferentes genótipos presentes nos cistos hidáticos, isolados na região estudada;
- Verificar a atuação do suíno como hospedeiro intermediário do *Echinococcus* spp. na área pesquisada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O gênero *Echinococcus*, descrito primeiramente por Rudolphi (1801) é composto por espécies pertencentes ao filo Platyhelminthes da classe Cestoda e família Taeniidae. Este parasito pode contaminar humanos e animais, podendo levar à morte quando não diagnosticada. Devido a sua distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes habitáveis, da EC está sendo considerada, atualmente, emergente em diversos países. Estima-se que ocorre cerca de 2 a 3 milhões de casos humanos em todo mundo (REY, 1991; OIE, 2011; GROSSO et al., 2012).

3.1 Morfologia

Echinococcus spp. adulto é constituído por: escólex (cabeça), onde encontra-se um rostro com duas fileiras de acúleos; estróbilo (corpo), constituído por três a quatro proglotes, sendo a primeira jovem, a segunda madura e a terceira grávida (Figura1) (REY, 1991; ECKERT et al., 2001).

A fase larvária do *Echinococcus* spp. é composta por uma estrutura cística, conhecida por cisto hidático ou hidátide (Figura 1). É de formato arredondado, preenchido de líquido claro, com numerosos protoescóleces, sendo esta a forma infectante para o hospedeiro definitivo (REY, 1991; FORTES, 2004). O cisto é formado por três membranas: a) membrana adventícia: a mais externa; b) membrana laminar, constituindo uma barreira à penetração de micro-organismos; c) membrana germinativa, que cumpre a função reprodutiva. No interior do cisto encontra-se também, a areia hidática que é composta por protoescóleces isolados, fragmentos de membrana e vesículas prolíferas. Os protoescóleces podem ser utilizadas na detecção da viabilidade do cisto hidático, tanto no HI, como no homem (ECKERT et al., 2001; VIRGINIO et al., 2012).

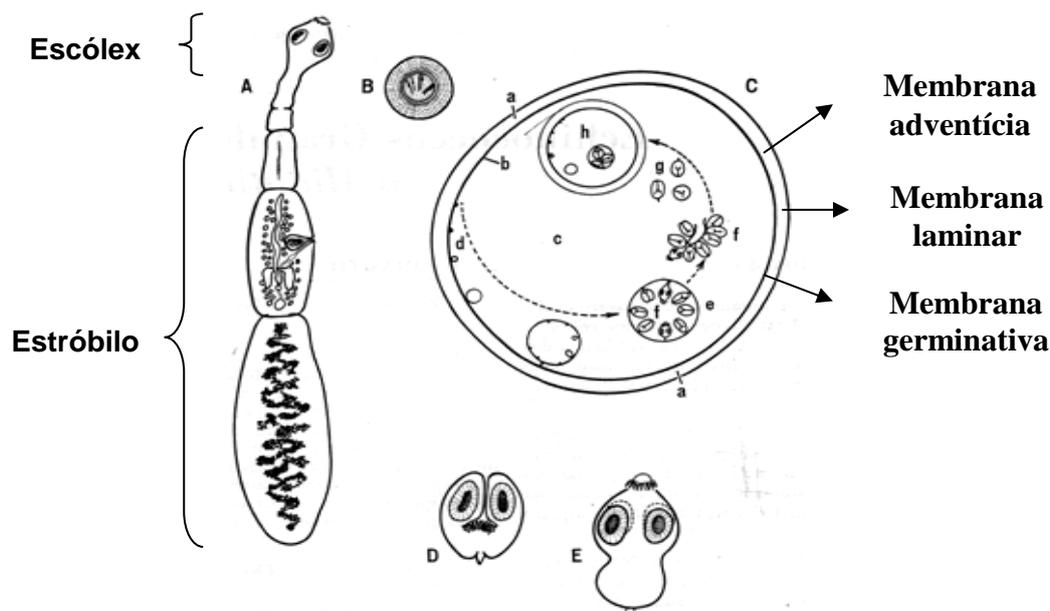


Figura 1. A. *Echinococcus* spp. adulto; B. Ovo; C. Cisto hidático com vesículas prolíferas; (d-e: hidátide filhas e netas); D. Protoescólex invaginado; E. Protoescólex desinvaginado (presentes no interior do cisto hidático).

Fonte: Adaptado de REY (1991).

Taenia hydatigena é outro cestódeo da família Taeniidae, encontrada no RS. Ao contrário de outras tênias que tem seu desenvolvimento em humanos como *Taenia solium* e *Taenia saginata*, a *T. hydatigena* não causa qualquer dano à saúde humana. No entanto, seu desenvolvimento se dá principalmente em suínos, ovinos e bovinos, seus HI, onde desenvolve a sua fase larvária chamada de *Cysticercus tenuicollis*, tendo o cão como seu HD (NEVES, 2005; REY, 2011). As infecções causadas, nos HI, tanto pela *T. hydatigena*, quanto por *Echinococcus* spp., determina perdas na indústria de carnes, devido ao descarte das vísceras contaminadas ou até mesmo a condenação da carcaça nos frigoríficos. Além disso, induzem a erros na identificação, pois os dados epidemiológicos relacionados à prevalência de equinococose em frigoríficos são realizados por análise macroscópica do cisto (KNAPP et al., 2011).

Por não causar qualquer dano à saúde dos seres humanos a *T. hydatigena* vem sendo utilizada com segurança, como modelo de estudo, sendo útil na compreensão de aspectos fundamentais que ocorrem na infecção por parasitos da família Taeniidae, são também de grande importância para prever as atividades do

parasito no ambiente, no cão, bem como para estabelecer medidas de controle e prevenção eficazes na zona rural (TORGERSON; HEATH, 2003). Sua identificação em HI é válida, pois motiva o tratamento de cães em regiões endêmicas, a fim de evitar prejuízos à indústria de carnes.

3.2 Ciclo Biológico

E. granulosus adulto tem seu habitat natural no intestino delgado dos HD (canídeos domésticos e selvagens). O parasito adulto leva em média 35 a 40 dias para atingir o seu desenvolvimento completo, surgindo assim os primeiros ovos embrionados no anel gravídico. O parasito normalmente encontra-se fixado no intestino do HD por meio de suas ventosas e acúleos, e os movimentos de contração dos estróbilos levam ao desprendimento das proglotes gravídicas, as quais contêm os ovos, e são expulsas juntamente com as fezes do HD (ECKERT et al., 2001; FORTES, 2004; NEVES, 2005). A longevidade do *Echinococcus* spp. é aproximadamente de 3 a 4 meses no organismo do HD. Depois de decorrido este tempo pode haver a permanência no interior do intestino, porém na forma infértil (ECKERT et al., 2011).

A oncosfera ou o embrião hexacanto são envolvidos pelo embrióforo, sendo este conjunto chamado de ovo. No interior de uma proglote gravídica pode-se encontrar de 400 a 800 ovos infectantes prontos para contaminar os HI (ECKERT et al., 2001). No ambiente, os ovos podem durar até 21 dias em águas pouco profundas ou areia úmida e 11 dias em contato com o ar (REY, 1991).

Os principais HI do *E. granulosus* são ovinos, caprinos, suínos e bovinos, estes contaminam-se ao ingerirem alimentos e/ou água contaminados com os ovos do parasito. No intestino delgado, ocorre a penetração do parasito pela mucosa, podendo distribuir-se aos diferentes órgãos, onde ocorrerá a formação do cisto hidático (ECKERT et al., 2001).

Os cães contaminam-se após a ingestão do cisto hidático viável presente nas vísceras cruas oriundas do HI. Os protoescoléces, presentes no intestino delgado,

maturam-se e transformam-se em parasitos adultos, completando o ciclo do *Echinococcus* spp. (Figura 2) (ALMEIDA et al., 2008).

Os humanos são considerados hospedeiros acidentais, uma vez que não fazem parte do ciclo de vida natural do parasito. Estes se contaminam acidentalmente ao ingerir água e/ou alimentos contendo ovos do parasito ou contato direto com cães contaminados com *Echinococcus* spp. (ECKERT et al., 2001).

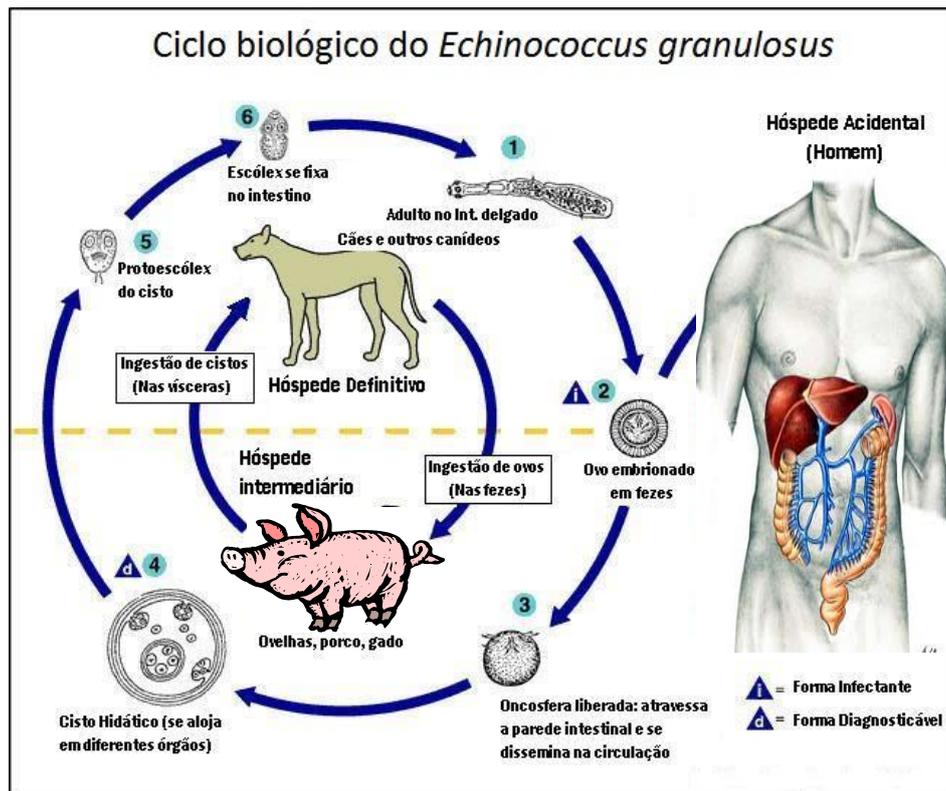


Figura 2 - Ciclo biológico do *Echinococcus granulosus*.

Fonte: Adaptado de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Echinococcosis.htm>

3.3 Taxonomia

Atualmente, estudos moleculares auxiliam na revisão taxonômica do gênero *Echinococcus* spp., pois além da identificação e da caracterização mais precisa e específica deste parasito, auxiliam nas análises epidemiológicas, a fim de encontrar

focos desta infecção (MOKS et al., 2008; THOMPSON, 2008; de la RUE et al., 2011).

As relações filogenéticas de *Echinococcus* spp. revelaram ciclos domésticos e silvestres com diferentes graus de patogenicidade para os animais e humanos (ECKERT et al., 2001). Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento de DNA obtidos a partir de diferentes marcadores gênicos como subunidade mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I (cox-I)* e desidrogenase NADH I (NDI) estão sendo utilizadas por vários autores na identificação de espécies e genótipos de *Echinococcus* spp. (BOWLES et al., 1992; BOWLES; MCMANUS, 1993; KAMENETZKY et al., 2002; XIAO et al., 2003; THOMPSON et al., 2006; CRUZ-REYES et al., 2007; NAKAO et al., 2007; MOKS et al., 2008; de la RUE et al., 2011).

A equinococose é causada por várias espécies de *Echinococcus*, sendo que as quatro principais incluem: *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1863), *Echinococcus oligarthrus* (Rausch & Bernstein, 1972), *Echinococcus vogeli* (Diesing, 1863) e *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786). Outras duas espécies foram recentemente relatadas, o *Echinococcus shiquicus* (Xião et al., 2005) e também o *Echinococcus felidis* descrito primeiramente por Otleppi (1937), mas reconhecido como espécie após análises descritas por Huttner et al. (2008) (HUTTNER et al., 2008; OIE, 2011; GROSSO et al., 2012).

E. vogeli e *E. oligarthrus* em sua fase adulta encontram-se parasitando canídeos e felídeos selvagens, sendo que em sua fase larvária podem ser encontrados parasitando roedores selvagens. Estão distribuídos principalmente nas Américas Central e do Sul. No Brasil há casos raros documentados, no estado do Acre (ECKERT et al., 2001; PASTORE et al., 2003).

E. multilocularis abrange, principalmente um ciclo de vida selvagem, seu HD geralmente é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), a fase larvária desenvolve-se preferencialmente em roedores selvagens. No entanto, a distribuição é predominantemente no hemisfério norte (ECKERT et al., 2001).

A EC é causada pelo *E. granulosus sensu lato*, sendo esta a espécie mais amplamente difundida por todo mundo, constituindo um grande problema de saúde pública (GROSSO et al., 2012). Este acomete preferencialmente canídeos (HD) e diversos HI como: suínos, bovinos, ovinos, caprinos entre outros, também acomete acidentalmente os humanos (ECKERT et al., 2001; de la RUE, 2008).

E. granulosus apresenta uma maior variação intraespecífica quando comparado a outras espécies do gênero *Echinococcus*, podendo ser caracterizado como *Echinococcus granulosus sensu lato* (MCMANUS; THOMPSON, 2003; BALBINOTTI et al., 2012). As diferenças detectadas entre as variantes, da espécie *E. granulosus sensu lato*, são: morfologia, taxa de virulência, distribuição geográfica, maturação no hospedeiro intermediário, entre outras. Através destas, houve uma caracterização em genótipos, também chamadas cepas e linhagem (ECKERT et al., 2001; THOMPSON, 2008; OIE, 2011).

Algumas diferenças encontradas entre estes genótipos são tão importantes quanto às encontradas entre as espécies do mesmo gênero, o que leva a categorização destas em espécies válidas (THOMPSON; MCMANUS, 2002; NAKAO et al., 2007), incluindo: genótipo G1/G2/G3 oriundas de ovinos, ovinos da Tasmânia e búfalos, respectivamente, foram caracterizadas em *Echinococcus granulosus sensu stricto*. O genótipo G4, linhagem equina, chamado de *Echinococcus equinus* e a cepa bovina G5 corresponde ao *Echinococcus ortleppi*. Os genótipos G6/G7/G8/G9/G10, encontram-se sob discussão taxonômica, alguns autores classificam-nas como *Echinococcus canadensis* descrita primeiramente por Webster e Cameron (1961) (LAVIKAINEN et al., 2003; THOMPSON et al., 2006; NAKAO et al., 2007; HUTTNER et al., 2008; MOKS et al., 2008; SNABEL et al., 2009). Entretanto, Saarma et al., (2009) descreveram *E. canadensis* abrangendo a cepa G8 e G10 e confirma uma nova subespécie descrita por Lopez-Neyra e Soler Planas (1943) chamada *Echinococcus intermedius*, onde abrangeria as cepas G6/G7/G9, proveniente de camelos e suínos. Para realização deste estudo, considerou-se *E. canadensis* abrangendo da cepa G6 a G10.

É necessário entender a genética, estrutura molecular e antigênica do parasito, bem como as diferenças existentes entre as cepas de *Echinococcus* spp., pois estas características podem representar importantes aspectos no controle da equinococose, desta forma a suscetibilidade à infecção de humanos por alguns táxons tem sido relatada por diversos autores (ECKERT; THOMPSON 1997; KAMENETZKY et al., 2002; BART et al., 2006; GROSSO et al., 2012).

E. granulosus sensu stricto (G1) parece ser amplamente distribuído, principalmente em áreas onde a atividade pecuária é predominante, com criação extensiva de ovinos (ROMIG, 2003; ANDRESIUKI et al., 2009; GROSSO et al., 2012). Na América do Sul, o genótipo G1 foi relatado em países como Argentina,

Chile, Peru, Bolívia e Uruguai (ROSENZVIT et al., 1999; KAMENETZKY et al., 2002; de la RUE et al., 2011). No Brasil, a ocorrência da cepa G1 já foi descrita em ovinos, bovinos, cães e humanos (HAGG et al., 1999; de la RUE et al., 2006; de la RUE et al., 2011).

Em 2011, de la RUE et al., descrevem 4 casos de EC cepa G1 em humanos no RS, onde a frequência deste genótipo pode estar provavelmente relacionada com o nível de contaminação parasitária no ambiente causada por cães, onde bovinos, ovinos e humanos ficam susceptíveis a esta contaminação.

A possibilidade de ocorrência do *E. canadensis* (G7) em humanos é considerada rara. No entanto, há regiões em países como a Polônia, Lituânia, Áustria, onde a cepa G7 está presente, ou até mesmo, tornou-se dominante (PAWLOWSKI; STEFANIAK, 2003; ŠARKŪNAS et al., 2010, SCHNEIDER et al., 2010), em animais o *E. canadensis* (G7) foi descritos recentemente no México, Argentina, Peru (CRUZ-REYES et al., 2007; MORO et al., 2009; SORIANO et al., 2010). Os suínos são os mais acometidos por este genótipo, por isto a denominação cepa suína. Entretanto têm-se relatos desta cepa acometer outros HI (cabras, javalis) e cães (KEDRA et al., 1999; KAMENETZKY et al., 2002; VARCASIA et al., 2007). O parasito adulto do *E. canadensis* genótipo G7 tem curto período pré-patente, de aproximadamente 34 dias. Desta forma o seu desenvolvimento é mais curto em relação à cepa G1 (período de 45 dias), necessitando assim, de um esquema de tratamento diferenciado com anti-helmíntico para os cães, a fim de romper o ciclo de vida do parasito (ŠNÁBEL et al., 2009).

3.4 Epidemiologia

E. granulosus sensu lato tem uma distribuição cosmopolita, considerado endêmico em várias regiões do mundo, sua maior prevalência é encontrada em algumas partes da Eurásia, África, Áustria e América do Sul (Figura 3) (ECKERT et al., 2001).

Os locais endêmicos da equinococose geralmente são as pequenas e médias propriedades produtoras de carne, incluindo especialmente, a ovina, a caprina, a bovina e a suína, onde a criação e o abate dos animais ocorrem na maioria das

vezes de forma artesanal e não apresentam inspeção veterinária. Estas propriedades geralmente apresentam coexistência do parasito e dos seus hospedeiros, levando à contaminação do meio ambiente e mantendo o seu ciclo biológico. Estes locais são considerados as zonas de risco à sanidade dos animais de produção e da população humana (de la RUE, 2008).

Segundo Eckert et al. (2001), *E. granulosus* foi introduzido na América do Sul através de animais domésticos importados de regiões potencialmente endêmicas. Diferentes genótipos de *E. granulosus sensu lato* possuem diferentes distribuições, conforme sua adaptação ao HI.

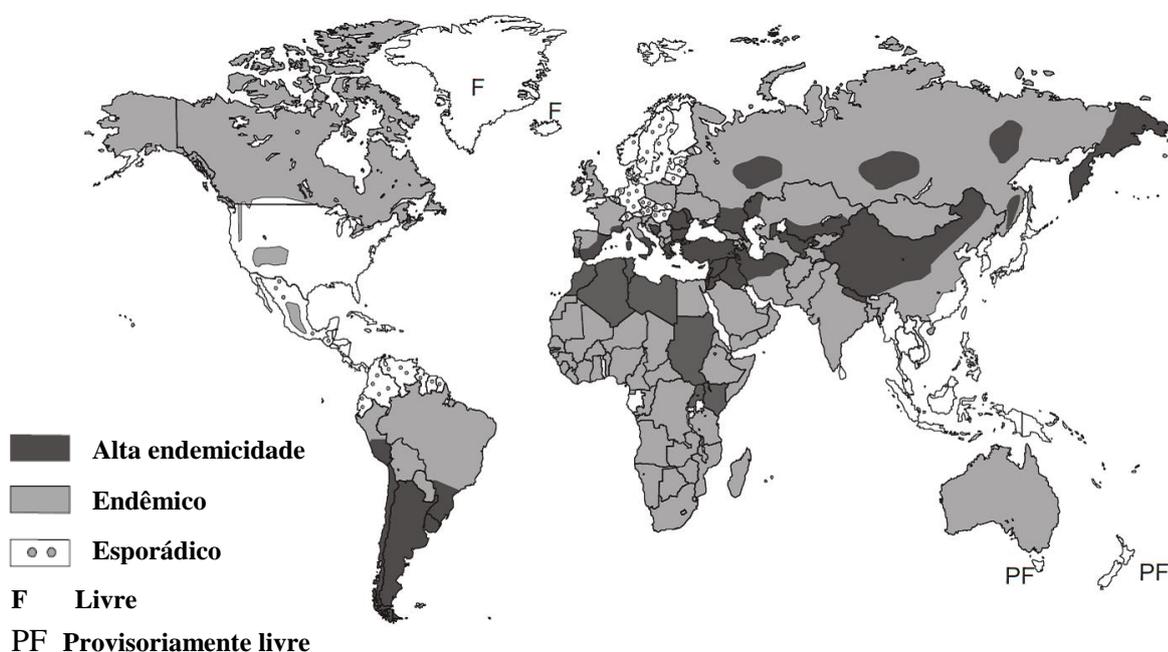


Figura 3 - Distribuição geográfica mundial de *Echinococcus granulosus sensu lato*.

Fonte: Adaptado de ECKERT et al., (2001).

O genótipo G1 é o mais amplamente distribuído no mundo, tem sido relatado na Europa, Oriente Médio, África, parte da Ásia, Austrália, Nova Zelândia, além de América do Norte e do Sul. Na América do Sul identifica-se uma grande endemicidade da cepa G1, além desta, encontra-se os genótipos G1/G2/G3 que corresponde ao *E. granulosus sensu stricto*, *E. ortleppi* (G5) e *E. canadensis*, cepas G6 e G7 (ROSENZVIT et al., 1999; KAMENETZKY et al., 2002; BADARACO et al., 2008; OIE, 2011).

No Brasil, a maioria dos casos de EC é originada no estado RS, onde os primeiros casos foram conhecidos no início do século XX (de la RUE, 2008). A metade sul do RS tem como principais atividades econômicas a agricultura e pecuária. Nas fazendas o hábito de usar cães para auxiliar na criação de ovinos, juntamente com a prática de alimentá-los com vísceras cruas destes animais, ajuda na perpetuação do ciclo de vida do parasito (FARIAS et al., 2004; de la RUE, 2008).

3.5 Transmissão

A evolução do ciclo do *Echinococcus granulosus sensu lato* está estreitamente relacionado à manutenção do agente etiológico nos hospedeiros e no meio ambiente, sendo que o descuido do *status* sanitário dos cães, habitantes das propriedades rurais, traz riscos de perpetuação do ciclo do parasito (de la RUE, 2008).

Os abates clandestinos, sem a devida inspeção sanitária, e o fornecimento de vísceras cruas contaminadas oriundas dos HI aos cães, auxiliam na disseminação do parasito, contaminando humanos e animais (DINKEL et al., 2004).

Além do meio rural, o urbano vem se destacando como potencial reservatório de ovos de *Echinococcus granulosus sensu lato*. Segundo Hoffmann et al. (2001) em Dom Pedrito, RS, os cães urbanos foram identificados como possíveis contaminantes, trazendo riscos à população. Sabe-se que a equinococose canina é a forma infectante direta para humanos. Assim, o conhecimento, sobre o ciclo, profilaxia e controle de equinococose em locais endêmicos são imprescindíveis.

3.6 Equinococose Cística

3.6.1 Em Humanos

No Rio Grande do Sul, em humanos desde 1987 a notificação da doença não é obrigatória, sendo assim a epidemiologia desta parasitose não é está totalmente

conhecida (KLOETZEL; PEREIRA, 1992). Mardini e Souza, (1999) encontraram 701 casos cirúrgicos de retina de cisto hidático no RS, entre os anos de 1981 a 1998.

Entretanto, após o estudo, somente através de relato de casos, pode-se avaliar a existência da EC em humanos. Há relatos descrevendo a presença de cisto hidático pulmonar em paciente residente de Brasília (DF) em 1997; cisto hidático pulmonar gigante em homem da cidade de São Gabriel (RS) em 2001; e relato de seis casos de EC humana na cidade de Sant'Ana do Livramento (RS), no ano de 2011; entre outros (ALMEIDA et al., 1997; MOREIRA et al., 2001; de la RUE et al., 2011).

De la Rue (2008) relata um estudo realizado em 1999, pela Secretaria de Saúde do Estado do RS, onde avaliou-se a prevalência de casos de EC, através de sorologia, em 7.415 habitantes de 18 municípios das regiões de fronteira (Brasil/Argentina/Uruguai). Confirmando a incidência de EC, em humanos, na região sul e sudoeste do estado. Alguns municípios afetados pelo estudo, estão representado na figura 4.

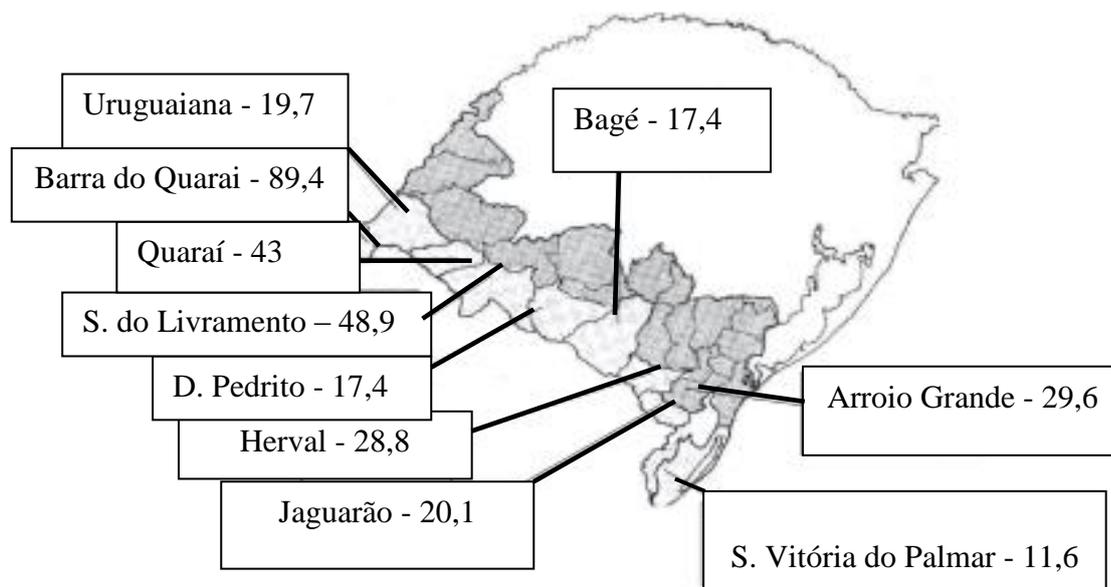


Figura 4 - Prevalência de equinococose cística humana em municípios da área endêmica do RS (/100.000 habitantes – 1999).

FONTE: Copiado de la Rue (2008).

A Argentina possui programas de controle de notificação da EC em todo país, através do Sistema Nacional de Vigilância da Saúde. Em 2010 a prevalência desta zoonose foi de 385 casos em humanos, comprovando a prevalência desta parasitose neste país (ARGENTINA, 2012).

A evolução do cisto hidático ocorre lentamente, assim os sintomas podem demorar anos para se manifestar, podendo causar sinais clínicos quando o cisto atingir grandes dimensões e/ou comprometer importantes funções no organismo. Normalmente crianças são mais suscetíveis à infecção por *Echinococcus* spp., por manterem um contato mais próximo com os cães, vindo a manifestar a doença anos após a contaminação (NEVES, 2005).

Os sinais clínicos dependem muito do local e do órgão parasitado. A compressão do órgão e aumento do volume abdominal é comumente relatado pelos pacientes, geralmente causando dor. A localização dos cistos hidáticos normalmente ocorre no fígado (80%) e nos pulmões (20%), sendo que nos demais órgãos como: rins, baço, cérebro, coração e medula óssea a ocorrência é menor (cerca de 0,5%). Isto, provavelmente, pode ser explicado pelo pequeno aporte sanguíneo destinado a estes órgãos, e grande aporte para o fígado e pulmão, uma vez que *Echinococcus* spp. utiliza a via sanguínea para atingir o órgão-alvo (ECKERT et al., 2001; GROSSO et al., 2012). Cistos pequenos, calcificados podem permanecer por anos no organismo de forma assintomática (FORTES, 2004).

As formas mais graves da doença podem surgir após a ruptura espontânea ou mecânica de um cisto hidático no organismo, levando ao extravasamento de líquido hidático o que pode desencadear choque anafilático, além da liberação de protoescóleces no organismo, podendo ocorrer a longo prazo a formação de cistos hidáticos secundários (NEVES, 2005).

3.6.2 Nos animais

No cão o quadro clínico geralmente é despercebido, porém quando há a infecção maciça pelo *Echinococcus* spp. pode haver o desencadeamento de diarreia catarral hemorrágica. Uma vez contaminado, o cão pode apresentar ovos do parasito pelo corpo todo, incluindo a região perianal, pelos e focinho (TORGERSON; HEATH, 2003; FORTES, 2004).

Nos HI, os sinais clínicos são muito variáveis, dependendo da espécie e do comprometimento do órgão parasitado, além do tempo de contaminação. Na maioria das vezes os sinais são inaparentes e a equinococose só é percebida pela ocasião do abate nas espécies de produção pecuária (ECKERT et al., 2001).

3.7 Tratamento

Nos humanos o tratamento depende basicamente do órgão comprometido, do estágio biológico larvário, bem como da quantidade de cistos hidáticos presentes no órgão afetado. A patogenia e os sinais clínicos dependem das alterações nas funções vitais, podendo incluir tanto processos irritativos, alérgicos ou mecânicos (NEVES, 2005).

Um dos métodos mais empregado é o tratamento por excisão cirúrgica, baseado na retirada do cisto do órgão. Este procedimento requer uma série de cuidados e habilidade do cirurgião, a fim de evitar o extravasamento do líquido hidático causando infecções de múltiplos órgãos. Aproximadamente 90% dos pacientes evoluem para a cura com este método (ECKERT et al., 2001).

O Método P.A.I.R. (Punção, aspiração, injeção e re-aspiração) desenvolvido na década de 80, é uma técnica cirúrgica que auxilia na retirada do cisto hidático, diminuindo as recidivas da doença e evitando o extravasamento do líquido hidático. Este consiste na punção do cisto hidático, com auxílio de seringa, aspiração do líquido e em seguida introdução de um escolicida, o qual se deixa atuar durante alguns minutos, a fim de inviabilizar as protoescoléces, após se reaspira o líquido presente no interior do cisto, podendo, assim haver a retirada total do mesmo (ECKERT et al., 2001; SILVA et al., 2001; NEVES, 2005).

O uso de medicamentos anti-helmínticos com o albendazol e mebendazol são úteis após o procedimento cirúrgico para evitar recidivas da doença, assim como no tratamento de cistos pequenos ou quando há vários órgãos afetados, nos casos cujo método invasivo não seria necessário (NEVES, 2005).

No tratamento das infecções pelo parasito adulto no HD, o praziquantel é o medicamento de escolha, pois age na permeabilidade da membrana celular, provocando a contração da musculatura, conseqüentemente levando a paralisia e morte dos parasitos. Além disso, o fato de ser administrado em uma dose única viabiliza o tratamento dos cães (REGERT, 2008).

O desenvolvimento de uma vacina eficiente em HI tem sido almejado por diversas pesquisas. O principal enfoque está na utilização de uma proteína recombinante expressa na oncosfera (EG95), a fim de conseguir níveis de proteção em ovinos e bovinos (GAUCI et al., 2005). Entretanto, o alto custo de produção pode inibir a aplicação em grandes escalas deste recurso (TONGESTON, 2006). Ovelhas vacinadas com o antígeno (EG95) são protegidas em média de 96-98%, contra o desenvolvimento de cistos hidáticos (LIGHTOWLERS et al., 1996). Segundo Lightowlers e Gauci (2001), a utilização da vacina em ovinos, tem sido tão bem sucedida, que pode-se considerar como um modelo de desenvolvimento da mesma para seres humanos.

3.8 Controle e Profilaxia

A identificação de áreas endêmicas é de extrema importância, pois as medidas profiláticas de educação sanitária devem convergir em áreas sob risco de contaminação. A profilaxia deve ser voltada para o esclarecimento da população sobre: os riscos à saúde pública, o ciclo de vida do *Echinococcus* spp., a importância em manter os animais de produção afastados do contato direto com os cães domésticos, bem como a necessidade de realizar o controle e o tratamento parasitológico dos cães portadores do *Echinococcus* spp.. É indispensável, porém, que todas as ações sejam desempenhadas de maneira sistemática, ininterrupta e

rigorosamente controlada, a fim de erradicar o parasito (ECKERT, et al., 2001; FORTES, 2004).

3.9 Prejuízos à indústria de carnes

Segundo Torgerson e Macpherson (2011) em torno de US\$ 2 bilhões, são perdidos pela indústria pecuária mundial, atualmente, devido a EC. No RS, em 2004, a prevalência de EC em bovinos foi de 12 a 16%, sendo que nos estados vizinhos de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso foi de 0,48/0,12/0,002% respectivamente, demonstrando a ocorrência significativa de EC no RS, acarretando maiores prejuízos econômicos para o estado (de la RUE, 2008).

O controle sanitário, constante em frigoríficos e os dados epidemiológicos e estatísticos acerca da equinococose em animais, é exercido pela Inspeção Veterinária. Estes dados são obtidos através dos relatos da presença de cistos hidáticos, visualmente observados durante a Inspeção Sanitária (BRASIL, 2012). Desta forma, uma correta identificação a cerca do cisto hidático é de extrema importância, pois o diagnóstico baseado somente pelo método visual não é o suficiente para identificação do cisto hidático (ECKERT et al., 2001).

O descarte de vísceras contaminadas em matadouros e frigoríficos e a morte de animais de alto valor zootécnico e comercial impedem a sua comercialização, conseqüentemente trazendo prejuízos ao setor de produção animal. Medidas profiláticas são extremamente necessárias em regiões endêmicas, a fim de evitar a propagação da doença (de la RUE et al., 2006; MONTEIRO, 2011).

3.10 Diagnóstico

O diagnóstico da EC em humanos é muitas vezes presuntivo baseado nos sinais clínicos e tecnologias de imagem (tomografia, ultrassonografia). Atualmente, técnicas de biologia molecular vêm desempenhando um papel muito importante

como auxiliar no diagnóstico desta relevante enfermidade, pois é uma metodologia de rápida detecção, com boa sensibilidade, especificidade e alta confiabilidade (ECKERT et al., 2001; FORTES, 2004; THOMPSON et al., 2006).

Em frigoríficos com abates inspecionados, a utilização de vísceras descartadas por contaminação pode ser útil no diagnóstico da equinococose em HI. Métodos moleculares ou análise de protoescoléces podem ser empregados visando um diagnóstico seguro. Desta forma, também, é possível rastrear as áreas endêmicas e futuramente fomentar ações visando o controle e a profilaxia da doença (CRUZ-REYES et al., 2007; HUTTNER et al., 2008; VIRGINIO et al., 2012).

Estudos em torno de um diagnóstico específico em EC vêm sendo desenvolvido por diversos autores (GONZALEZ et al., 2000; VIRGINIO et al., 2003). O Antígeno B (AgB) é uma lipoproteína abundante no interior do cisto hidático e tem sido considerado uma boa alternativa para imunodiagnóstico da EC, pois é considerado específico para o gênero *Echinococcus*. O AgB é produzido pelo parasito durante o desenvolvimento do metacéstóide, secretado principalmente, pela membrana germinativa e protoescoléces, sendo altamente imunogênico em humanos (MCMANUS; BRYANT, 1995 apud GRAICHEN, 2011; GONZALEZ et al., 2000; VIRGINIO et al., 2003). A biologia desta proteína não está bem determinada, mas pela grande quantidade presente no parasito, sugere-se um papel importante na sobrevivência do mesmo (BADARACO, 2007).

3.11 Análise Molecular

A análise molecular tem como objetivo primordial o estudo do material genético, especialmente incluindo a identificação e a caracterização molecular do agente etiológico. Dentre os diferentes métodos de biologia molecular, a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), aliada ao sequenciamento, vem sendo empregada para a identificação correta do *Echinococcus* spp., tanto na sua fase adulta, como na fase larvária. Além de serem amplamente utilizadas em estudos de análise filogenética ou filogenia (THOMPSON et al., 2006; SORIANO et al., 2010; de la RUE et al., 2011; SHAHNAZI et al., 2011).

A relação evolutiva entre as espécies, populações ou genes é conhecida por filogenia, auxiliando no conhecimento sobre a evolução de determinadas características de um organismo. Geralmente a filogenia é descrita com ajuda de uma árvore filogenética, que pode ser fundamentada em informações de sequências do DNA de uma espécie ou subespécie. Portanto, a utilização desta árvore contribui para a identificação específica das mudanças únicas em populações, ajuda no entendimento das adaptações destas ao ambiente e caracteriza uma corrente evolução (AMORIM, 2002; COX et al., 2011)

Com a utilização da análise filogenética podemos compreender os processos evolutivos, a extinção e a adaptação de espécies, e assim, inferir a história da evolução. Também constitui uma representação de ancestralidade, compreendida a partir de características morfológicas, fisiológicas e moleculares, entre outras (MIYAKI et al., 2001).

Entre os métodos de reconstrução de árvores filogenéticas as análises fenéticas utilizam medidas de distância ou de similaridade genética, que mostram as diferenças entre os caracteres em números, um modelo desta análise de reconstrução é o *Neighbor-Joining* é um método de evolução mínima, onde baseia-se no cálculo das distâncias evolutivas para todos os indivíduos e na construção de uma árvore que leva em consideração as relações entre todas as distâncias. Trata-se de um método rápido e apropriado para um grande conjunto de dados, permitindo linhagens com diferentes tamanhos de ramos e substituições múltiplas (SCHENEIDER, 2001; AVISE, 2004).

O gene mitocondrial da *citocromo c oxidase subunidade I (cox-I)* é amplamente utilizado em análises moleculares, com intuito de identificar as variantes existentes nas espécies e cepas dentro do gênero *Echinococcus* (BOWLES et al., 1992). A análise do DNA mitocondrial (mtDNA) é vantajosa, pois a mitocôndria apresenta um sistema de reparo do DNA com mutações frequentes, refletindo com precisão a via evolutiva dos isolados (AMORIM, 2002; KAMENETZKY et al., 2002). O emprego do mtDNA em estudos populacionais e evolutivos se vale principalmente do fato dele possuir uma alta taxa de substituições de base, apresentar alterações no tamanho total da molécula devido a inserções e deleções, além de ser

considerado um genoma compacto, pois raramente possui sequências espaçadoras, sequências repetitivas, pseudogenes e introns (ARIAS et al., 2003).

MANUSCRITO 1 – Submetido à Revista Veterinary Parasitology

A novel epidemiologic situation in southern Brazil: First report of *Echinococcus* spp. in swine

Danieli Urach Monteiro, Sônia de Ávila Botton, Alexandre Alberto Tonin, Karen L. Haag, Germano Musskopf, Maria Isabel Azevedo, Mário Luiz de la Rue

**A novel epidemiologic situation in southern Brazil: First report of
Echinococcus spp. in swine**

D. U. Monteiro¹, S. A. Botton¹, A. A. Tonin¹, K. L. Haag², G. Muskopf³, M. I.
Azevedo¹, M.L. de la Rue¹

- ¹. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, Brazil.
- ². Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Department of Genetics, Porto Alegre, Brazil.
- ³. Veterinarian.

Corresponding Author: mldelarue@hotmail.com

Address: Avenida Roraima, 1000. Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 20 – Sala 4226. CEP 97105-970, Santa Maria, RS, Brazil.

A novel epidemiologic situation in southern Brazil: First report of *Echinococcus* spp. in swine

Abstract: Cystic echinococcosis (CE) is a zoonosis of worldwide occurrence, causing several problems to public health, as well as economic losses in the meat industry. In Brazil, the occurrence of CE is predominant in the State of Rio Grande do Sul (RS), usually in border regions with Uruguay and Argentina. In the period between January 2008 and January 2012 a total of 3,101,992 swine were slaughtered in the central/northern region of RS and 58 animals had cysts with morphology consistent with CE. Macroscopic and molecular analyses were carried out in all the cysts. Polymerase chain reaction, through amplification of cytochrome C oxidase gene - subunit 1 (COX I), confirmed the positivity of 10.3% (06/58) for *Echinococcus* spp., 56.9% (33/58) for *Taenia hydatigena* and 32.8% (19/58) of the reactions were inconclusive. This analysis revealed the first report of *Echinococcus* spp. in these regions of RS, locations do not considered endemic yet. Furthermore, the results demonstrated that there is an evident failure in the swine meat inspection process, highlighted by the predominant occurrence of *T. hydatigena*, which impairs the official statistics.

Keywords: *Echinococcus* spp.; *Taenia hydatigena*; Rio Grande do Sul; pigs.

Introduction

Cystic echinococcosis (CE) is a zoonotic disease caused by genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae), being *Echinococcus granulosus sensu lato* the predominant species worldwide (Romig, 2003; Grosso et al., 2012). In South America it is widespread in different countries such as Brazil, Argentina and Uruguay

(Kamenetzky et al., 2002; de la Rue 2008). In Brazil, the disease is endemic in the southern part of Rio Grande do Sul State (RS), causing infection in animals and humans and leading to high economic expenses to livestock, as well as important concerns to public health (de la Rue et al., 2011; Haag et al., 2004).

Swine as a natural intermediate host (IH) of *E. granulosus sensu lato* has been reported recently in several countries and has an important role for maintaining the parasite life cycle (Bruzinskait et al., 2009; Šarkūnas et al., 2010; Sanchez et al., 2012; Schneider et al., 2010). According to Sanchez et al. (2012), swine have the capability of becoming infected with multiple genotypes of *E. granulosus*, proliferating the disease's cycle in the farms.

It is important to emphasize that swine breeding system is different of sheep and cattle in RS. Swine are breeding in intensive farming with restricted confinement, being only susceptible to few exterior factors of transmission, which may allow the parasitic contamination, for instance by taeniids (de la Rue 2008).

The differential diagnosis of *Echinococcus granulosus sensu lato* is of utmost importance in order to differentiate it from other species of the family Taenidae, such as *Taenia hydatigena* morphology which has cyst (larval stage), and cycle life similar to *Echinococcus granulosus sensu lato*. However they are harmless to humans (Slais and Vanek, 1980).

CE is considered a neglected disease in humans, since it is not a notifiable disease reported to public health departments in south of Brazil. On the other hand, the occurrence of echinococcosis in IH is mandatory, when the animals are slaughtered in establishment with official sanitary inspection, i.e. Federal Inspection Service (FIS) of the Brazilian Ministry of Agriculture. All recorded data by FIS are used in epidemiological surveys by the authorities in charge (de la Rue 2008, Brazil,

2008). This work aimed to verify the occurrence of *Echinococcus spp.* in viscera of swine slaughtered in slaughter-houses located in the central and northern regions of RS, Brazil.

Material and Methods

A total of 3,101,992 swine were slaughtered between January of 2008 and January of 2012 in the central/northern region of RS. All of them were inspected by the FIS, totalizing 58 cysts present in visceral tissues with similar morphology to hydatid cyst. All samples were identified according to breeding farm location, since the animals came from pig breeding farms with management and production within international standards, i.e. highly technified farms and subjected to a strict quality control involving animal welfare and sanitary conditions. The samples were stored in 70% ethanol and then sent to the laboratory of molecular biology and parasitology at Federal University of Santa Maria (Universidade Federal de Santa Maria, UFSM). The cysts were analyzed macroscopically through the observation of their shape and size. Total DNA was obtained of cyst fragments using a commercial kit (QIAamp[®] DNA Mini kit) (QIAGEN Inc. Chatsworth, CA), according to the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the mitochondrial gene COX I (cytochrome C oxidase subunit I) according to Bowles et al. (1992). DNA sequences obtained from sequencing were compared to sequences deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) using the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool).

Results

Macroscopic analysis of the samples demonstrated cysts with variation on their sizes and shapes. It was not possible to distinguish macroscopically peculiarities to differentiate cestode parasites.

Molecular technique was important to identify and distinguish the etiological agent existing in the cysts. PCR generated a fragment of approximately 366 base pairs and the results obtained were 10.3% (06/58) compatible with *Echinococcus* spp., 56.9% (33/58) with *T. hydatigena* and 32.8% (19/58) showed inconclusive results.

The origin places of the samples are shown in Figure 1. All of them are located in the central/northern regions of RS considered non endemic to *E. granulosus*, and distant about 450 km from the borderline with Uruguay and Argentina, which represent endemic areas for CE (Balbinotti et al. 2012; de la Rue 2008).

Discussion

The data obtained in our study demonstrates that *Echinococcus* spp. is present in swine in RS, Brazil. This is the first report of swine as IH of *Echinococcus* spp. in the studied area. Additionally, the results suggest that dogs are being feeding with contaminated viscera of IH, probably from cattle and sheep which came from endemic regions, carrying the larval stage of *Echinococcus* spp. and maintaining the parasite life cycle in the environment in the researched region. Probably, pig is not responsible for perpetuating the parasite cycle in that region, since the swine breeding farms are considerably technified and maintain strict quality control and sanitary conditions.

Furthermore, the transmission of parasite's eggs may be occurring among pig farms in that region probably due to their proximity. Other studies indicated that different taeniids eggs may be transported by mechanical means including birds and insects, or even through the wind (Lawson and Gemmell, 1990; Torgerson and Heath, 2003). Similar issues may be present in the pig farms favoring the local dispersion of the parasite eggs probably by insects such flies, which landing on the feces of infected dog become vectors, and they will contaminate the swine feed as well as the entire properties.

Macroscopic analysis conducted by FIS classified the 58 samples reported in this study as "probable hydatid cysts". However, after molecular analysis, it was evident only 10.3% of cysts were identified as *Echinococcus* spp.. In contrast, in a great number of samples (56.9%) was evidenced *T. hydatigena*. This fact indicates there are discrepant results released by the official inspection service based merely on the macroscopic analysis. Balbinotti et al. (2012) also demonstrated the importance of molecular analysis of *Echinococcus* spp. in cattle in Southern Brazil. Similar to this research, Bruzinskait et al. 2009 also reported the occurrence of both parasites, *Echinococcus* spp. and *T.hydatigena*, in cysts of swine from Lithuania.

In our study, 32.8% of cysts had inconclusive results. The lack on identification of these samples may be occurred due to the low amount of DNA present in the samples or a non-parasitic etiology of the cysts.

Epidemiological studies using molecular biology assays may be more accurate than macroscopic analyses in order to diagnose the contamination by taeniids parasites on the properties and in slaughter-houses. Besides, the correct identification of the etiological agent can instigate researches to identify potential

endemic sites, also it may support the establishment of programs to control and prevent CE in south of Brazil.

Hydatid cysts present in swine viscera is an important epidemiologic finding, since the occurrence of *Echinococcus* spp. indicates contamination in an area considered non-endemic in RS. Contamination foci were reported by other authors involving animals and humans located in the border with Argentina and Uruguay (de la Rue et al., 2011; Farias et al., 2004; Hoffmann et al., 2001), currently considered endemic for CE in Brazil. More investigation should be reached in order to identify new possible risk areas and factors for CE in RS.

Finalizing, in the present study swine was identified as potential natural IH for both, *Echinococcus* spp. and *T. hydatigena*, which may compromise the programs on animal health and economical losses, mainly due to viscera discards. In addition, it is necessary to achieve an accurate identification and a continuous monitoring of hydatid cysts, especially in slaughter-house, in order to avoid incorrect results and hazards to public health, as well as following the propagation of CE in the entire Brazilian southern region.

References

- Balbinotti, H., Santos, G.B., Badaraco, J., Arend, A.C., Graichen, D.A.S., Haag, K.L., Zaha, A., 2012. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 188, 255–260.
- Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P., 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 165-174.

- Brazil, 2008. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Department of Inspection of Animal Products (DIPOA). Management Information System of the Federal Inspection Service (SIGSIF). Brasília.
- Bruzinskait, R., Sarkunas, N., Torgerson, P.R., Mathis, A., Deplazes, P., 2009. Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Vet. Parasitol.* 160, 237–241.
- de la Rue, M.L., 2008. Cystic Echinococcosis in Southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 50, 53-56.
- de la Rue, M.L., Takano, K., Brochado, J., Costa, C.V., Soares, A.G., Yamano, K., Yagi, K., Katoh, Y., Takahashi, K., 2011. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 177, 97-103.
- Farias, L.N., Malgor, R., Cassaravilla, C., Bragança, C., de la Rue, M.L., 2004. Echinococcosis in Southern Brazil: Efforts Toward Implementation of a Control Program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 46, 153-156.
- Grosso, G., Gruttadauria, S., Biondi, A., Marventano, S., Mistretta, A., 2012. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean área. *World. J. Gastroenterol.* 18, 1425-1437.
- Haag, K.L., Ayala, F.J., Kamenetzky, L., Gutierrez, A.M., Rosenzvit, M., 2004. Livestock Trade History, Geography, and Parasite Strains: The Mitochondrial Genetic Structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *J. Parasitol.* 90, 234-239.

- Hoffmann, N.A., Malgor, R., de la Rue, M.L., 2001. Prevalence Of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) in urban stray dogs from Dom Pedrito in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*. 31, 843-847.
- Kamenetzky, L., Gutierrez, A.M., Canova, S.G., Haag, K.L., Guarnera, E.A., Parra, A., Garcia, G.E., Rosenzvit, M.C., 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect. Gent. Evol.* 2, 129–136.
- Lawson, J.R., Gemmell, M.A., 1990. Transmission of taeniid tapeworm eggs via blowflies to intermediate hosts. *Parasitology*. 100,143–146.
- Romig, T., 2003. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch. Surg.* 388, 209–217.
- Sanchez, E., Cáceres, O., Náquira, C., Miranda, E., Samudio, F., Fernandes, O., 2012. *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from an endemic region in Peru. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 107, 275-278.
- Šarkūnas, M., Bružinskaitė, R., Marcinkutė, A., Mathis, A., Deplazes, P., 2010. *Echinococcus granulosus* ('pig strain', G6/7) in Southwestern Lithuania. *Acta Vet. Scand.* 56, S14.
- Schneider, R., Gollackner, B., Schindl, M., Tucek, G., Auer, H., 2010. *Echinococcus canadensis* G7 (Pig Strain): An Underestimated Cause of Cystic Echinococcosis in Austria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 871–874.
- Slais, J., Vanek, M., 1980. Differential diagnosis of cysticerci of *Taenia hydatigena* and hydatids of *Echinococcus granulosus*. *Angew. Parasitol.* 21, 16-20.

Torgerson, P.R., Heath, D.D., 2003. Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*. 127,143–158.

Figure 1.

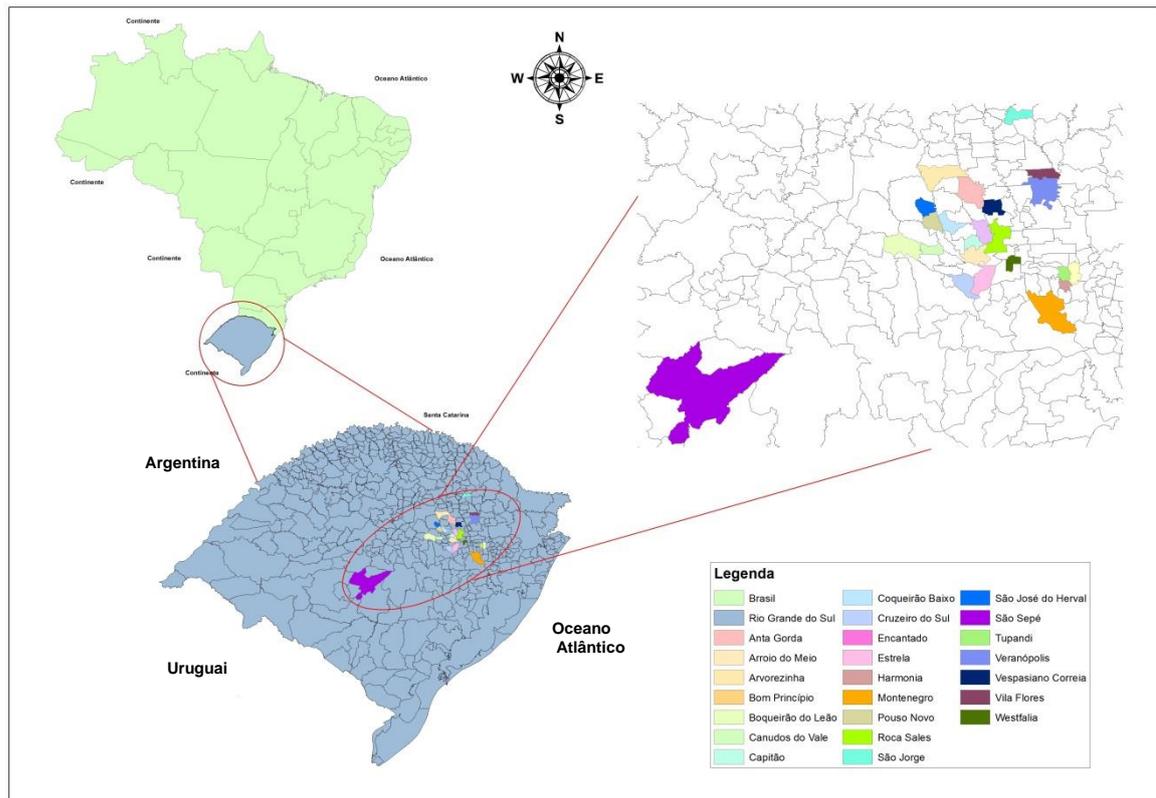


Figure 1. Map of Rio Grande do Sul, Brazil. The map emphasizes the municipalities in central/north region where are located the swine breeding farms in RS, corresponding the studied area.

**MANUSCRITO 2 – A ser submetido à Revista Parasitology Research.
Aguardando número de acesso das sequências, fornecido pelo Genbank.**

Echinococcus canadensis (G7) and Echinococcus granulosus sensu stricto (G1) in swines of southern Brazil.

Danieli Urach Monteiro, Sônia de Ávila Botton, Alexandre A. Tonin, Maria Isabel Azevedo, Daniel Ângelo S. Graichen, Charlise Bolson Noal, Mário Luiz de la Rue

Echinococcus canadensis (G7) and Echinococcus granulosus sensu stricto (G1) in swines of southern Brazil

D. U. Monteiro¹, S. A. Botton¹, A. A. Tonin¹, M. I. Azevedo¹, D.A.S. Graichen², C.B. Noal¹, M.L. de la Rue¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, Brazil.

² Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Department of Genetics, Palmeira das Missões, Brazil

Corresponding Author: mldelarue@hotmail.com

Address: Avenida Roraima, 1000. Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 20 – Sala 4226. CEP 97105-970, Santa Maria, RS, Brazil.

***Echinococcus canadensis* (G7) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) in swines of southern Brazil**

Abstract: The Cystic Echinococcosis (CE) is an important zoonotic disease caused by the parasite *Echinococcus* spp. In Brazil, this parasite is present in the state of Rio Grande do Sul (RS), causing several damages to human and animal health. This study aimed to identify the different genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in hydatid cysts of swine viscera, as well as establishing the similarity between these samples through the phylogenetic tree. During a period of 48 months, a total of 3,101,992 swines were slaughtered in the central / northern region of RS. From them, five showed cysts in their viscera. Based on molecular analysis techniques, the samples were, then, characterized as hydatid cysts. Amplification, sequencing and phylogeny were based on the use of the mitochondrial gene *Cytochrome C Oxidase Subunit I (cox-I)*. The molecular analysis revealed the presence of two distinct genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in samples. A total of five cysts, two were positive for *E. granulosus sensu stricto* (G1) and three for *E. canadensis* (G7). The results indicate the presence of potentially infectious strains for humans in the central/northern region of RS, generating eminent risk of contamination for humans and animals, as well as perpetuation of the parasite life cycle.

Keywords: *Echinococcus granulosus sensu stricto*; *Echinococcus canadensis*; Rio Grande do Sul; *cox-I*; Swine.

Introduction

The cystic echinococcosis (CE) is a disease caused by parasites of the genus *Echinococcus*, which causes many health problems in different regions of the world, and it is currently considered as a neglected parasitic disease in many countries. In Brazil, the highest prevalence lays on the state of Rio Grande do Sul (RS), mainly in regions bordering with Argentina and Uruguay, countries that are considered potentially endemic for this parasite. Rural areas are the most affected, since

livestock production is one of the main economic activities in the state (de la Rue et al. 2006; de la Rue 2008; Moro and Schantz 2009).

Echinococcus granulosus sensu lato is the prevalent in southern Brazil, developing a life cycle that involves dogs as definitive host (DH), hosting the adult parasite in their intestines; and mainly cattle, sheep and swines serving as intermediate hosts (IH), which are able to carry and host the larval stage of *Echinococcus* spp.. Humans are considered accidental hosts of the parasite (de la Rue 2008; Eckert et al. 2001).

The mitochondrial gene *cytochrome c oxidase subunit I (cox-I)* has been considered as a good marker for intraspecific classification of genetic variability of *E. granulosus*. Additionally, phylogenetic analysis has assisted in identifying variations among strains in order to understand the evolutionary processes of each species of *Echinococcus*. (Bowles et al. 1992; Casulli et al. 2012).

The genotypes reported for *E. granulosus sensu lato* in southern Brazil include: *E. granulosus sensu stricto* (G3 and G1); *E. ortleppi* (G5), and *E. canadensis* (G7), usually affecting sheep, cattle, dogs and humans (Badaraco et al. 2008; de la Rue et al. 2006; de la Rue et al. 2011). G1 genotype has been described in several countries as the main cause of CE in humans, and it is widespread in Peru, Chile, Argentina and Brazil (de la Rue et al. 2011; Grosso et al. 2012). The occurrence of swine strain (G7) in humans is considered rare because of its low infectivity in humans, as well the small number of cases diagnosed with this strain (Eckert and Thompson 1997). However, there are countries in which this genotype is present, or even it is prevalent (Cruz-Reyes et al. 2007; Sarkunas et al. 2010; Schneider et al. 2010).

Genotypes G1 and G7 are morphological and genetic different in some aspects, as well as in their cycle in the host (Thompson and McManus 2002). However, both have are able of develop in swines and humans, causing damage to the public health, as well as to the meat industry. Based on the presented aspects, this study aimed to characterize, molecularly, the isolates of *Echinococcus* spp. obtained from viscera of swines containing cysts, identifying genetic variants present in a potentially endemic area in southern Brazil.

Material and Methods

Biological Samples

Biological samples evaluated in this study consisted of cysts obtained from viscera of swines slaughtered in the central/northern region of Rio Grande do Sul, from January 2008 to 2012. The cysts were stored in 70% ethanol and subsequently characterized by molecular analysis.

Molecular Analysis

DNA extraction was performed from a fragment of hydatid cyst using a commercial kit (QIAamp tissue) (QIAGEN Inc. Chatsworth, CA) according to manufacturer's instructions. PCR was performed using a pair of primers for amplification of the gene fragment *cox-1*, according to the protocol previously published (Bowles et al., 1992), with modifications, including the following conditions: initial denaturation of 94 °C/3min, followed by 30 cycles of: denaturation at 94 °C/30s, 52 °C/40s annealing and extension 72 °C/45s, finishing with 72 °C/10min. The reactions were performed in a thermocycler model PTC 100 (MJ Research, Inc.). To detect the pattern of bands the gel electrophoresis in 1% agarose was performed, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The products were purified with PCR Purification Kit - PureLink (Invitrogen) and sequenced on an automated sequencer (MegaBACE500) using the DYEnamic ET kit (Amersham) along with the same primers used in PCR.

Phylogenetic Analysis

The sequence similarity analysis of DNA amplified samples of gene *cox-1* was carried out with using BLAST program (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The phylogenetic analysis was performed using the Gap4 software/Staden package (Staden, 1996). The sequences used for comparison with samples studied were obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>), including: M84661 (G1-Bowles et al. 1992); M84667 (G7-Bowles et al. 1992); M84665 (G5- Bowles et al. 1992); GU980906 (G1- Soriano et al. 2011) e GU980914 (G7- Soriano et al. 2011). The AB243755 (*Taenia solium*- Sato et al. 2005) was used as outgroup. The phylogenetic tree was constructed through Neighbor-Joining Analysis (NJ), where the data sets alignments were performed

using the Clustal W algorithm in the software MEGA 5 (Tamura and Nei 1993). The bootstrap number was a 1000 replicates.

Results

PCR analysis of the five strains obtained in this study amplified a fragment of approximately 366pb, corresponding to the mitochondrial gene *cox-1*. The DNA sequences generated were compared with sequences in Genbank obtaining two samples with similarity to *E. granulosus sensu stricto* (G1) and three with *E. canadensis* (G7). The samples obtained in this study were deposited in Genbank under number of submission: Banklt 1461571, Banklt 1461578, Banklt 1461585, Banklt 1461590 and Banklt 1461594.

The phylogenetic tree revealed two distinct groups (Fig. 1), where samples with genotype G7 were grouped to compose the M1 group. M2 group was composed by the grouping sequences of G1 genotype. The samples were compared with reported isolates from Argentina by Soriano et al. (2010), where the sample G1 came from sheep and the G7 was from swines.

Discussion

The identification of strains and species of *Echinococcus* spp. prevalent in each endemic region is extremely important for effective control of the CE, since some features such as human infectibility, maturation period of the parasite in the host, geographic distribution, among others are different between strains and these factors may cause various health hazards to human and animal (de la Rue et al. 2011; Thompson and McManus 2002).

In this sense, the molecular analysis using the *cox-1* gene showed two distinct genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato*: Genotype G7, specifically related to swine hosts; and genotype G1, usually from sheep and often associated with CE in humans. Similar results were reported in Peru, using the same molecular approach and demonstrating the presence of the same genotypes (G1 and G7) isolated from swines (Sanchez et al. 2012). These results clearly showed the infectability of swines front to multiple strains of *Echinococcus*, placing this specie as a potential host of this zoonosis (Eckert and Thompson 1997).

In addition, the phylogenetic tree analysis showed similarity of samples present in the group M1 where the sequences corresponding to genotype G7 were grouped. All the samples were from swines, suggesting a probability of this genotype to be widespread between Brazil and Argentina (Soriano et al. 2010); perhaps, the strain dissemination may have happened through the regions of Brazil bordering with this country. M2 group met isolates of G1 genotype isolated in this study, with isolate G1 of a sheep from Argentina (Soriano et al. 2010). This parity among sequences, suggests the probability of this strain to be genetically conserved in different geographical areas. De la Rue et al. (2011) and Balbinotti et al. (2012) reported the G1 genotype present in cattle, dogs and humans in the southwest region of the RS; therefore, reporting the presence of the strain at the border with Argentina. Probably the G1 strain migrated through the commerce of sheep and cattle in RS, reaching the central/northern regions of the state (major concentration of swines in RS), allowing, then, the adaptation of the parasite to a new host.

Swines as a host of G1 strain has been reported by other authors as Soriano et al. (2010) in Argentina and Varcasia et al. (2006) in Italy, confirming the possible adaptation of this strain in pigs, as well as the high infectibility of this genotype. Hobbs et al. (1990) already reported the probability of swines be considered as an accidental host of *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) in regions where this strain predominates. The report of G1 strain in swines in central region of RS is concerning, since it consists in a new host susceptible to a highly infecting strain. Therefore, caution with prophylaxis and epidemiology of this zoonotic disease should be intensified.

E. canadensis (G7) is considered the predominant strain in swines with reports by several authors, reaching countries like Lithuania, Mexico, Peru and Argentina (Cruz-Reyes et al. 2007; Bruzinskaite et al. 2009; Sanchez et al. 2012; Soriano et al. 2010). However, there is a report in southern Brazil concerning about the occurrence of G7 strain in cattle (Badaraco et al. 2008), representing it another possible host. In this study it was confirmed the occurrence of G7 strain in RS state, representing its first report in swines in the studied area. Thus, it is possible to suggest the actions of spreading and adaptation of this strain to different hosts in different regions of the state.

The fact that swines are able to host *E. granulosus sensu stricto* (G1) and *E. canadensis* (G7) has considerable implications for the implementation of control

program against CE due to differences in the parasite maturation, specially for adult forms, where are necessary 34 days for G7 and 45 for G1 strain, complicating the regular drug treatment for dogs (Thompson and McManus 2002). Thus, the strain identification in this region consists in a high importance factor, in order to establish an effective treatment for eradication of the parasite.

Therefore, swines represent a potential intermediate host for the genus *Echinococcus*, with the possibility of their adaptation to different genotypes. *E. granulosus sensu stricto* (G1) and *E. canadensis* (G7) are present in the central/northern RS, probably in small swine farms. Additional studies, involving a larger number of samples, must be run in order to demonstrate the importance of these strains in swine, and especially a human EC.

References

- Badaraco JL, Ayala FJ, Bart JM, Gottstein B, Haag KL (2008) Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. *Exp Parasitol* 119: 453–459
- Balbinotti H, Santos GB, Badaraco J, Arend AC, Graichen DAS, Haag KL, Zaha A (2012) *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet Parasitol* 188: 255–260
- Bowles J, Blair D, McManus DP (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54: 165–174
- Bruzinskait R, Sarkunas N, Torgerson PR, Mathis A, Deplazes P (2009) Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Vet Parasitol* 160: 237–241
- Casulli A, Interisano M, Sreter T, Chitimia L, Kirkova Z, Rosa G, Pozio E (2012) Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infect Genet Evol* 12: 377–383

Cruz-Reyes A, Constantine CC, Boxell AC, Hobbs RP, Thompson RCA (2007) *Echinococcus granulosus* from Mexican pigs is the same strain as that in Polish pigs. *J Helminthol* 81: 287–292

De la Rue ML (2008) Cystic Echinococcosis in Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 50: 53-56

De la Rue ML, Takano K, Brochado J, Costa CV, Soares AG, Yamano K, Yagi K, Katoh Y, Takahashi K (2011) Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. *Vet Parasitol* 177: 97-103

Eckert J, Thompson RCA 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop* 64: 19-34

Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawłowski ZS (2001) WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. World Organization for Animal Health and World Health Organization, Paris, France 19-21

Grosso G, Gruttadauria S, Biondi A, Marventano S, Mistretta A (2012) Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World J Gastroenterol* 18: 1425-1437

Hobbs RP, Lymbery AJ, Thompson RC (1990) Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch,1786) from natural and experimental Australian hosts, and its implications for strain recognition. *Parasitol* 2: 273-81

Moro P, Schantz PM (2006) Cystic echinococcosis in the Americas. *Parasitol Int* 55: 181–186

Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 5: 233–241

Sanchez E, Cáceres O, Náquira C, Miranda E, Samudio F, Fernandes O (2012) *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from an endemic region in Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 275-278

Šarkūnas M, Bružinskaitė R, Marcinkutė A, Mathis A, Deplazes P (2010) *Echinococcus granulosus* ('pig strain', G6/7) in Southwestern Lithuania. *Acta Vet Scand* 56: S14

Schneider R, Gollackner B, Schindl M, Tucek G, Auer H (2010) *Echinococcus canadensis* G7 (Pig Strain): An Underestimated Cause of Cystic Echinococcosis in Austria. *Am J Trop Med Hyg* 82: 871–874

Soriano SV, Pierangeli NB, Pianciola L, Mazzeo M, Lazzarini LE, Saiz SM, Kossman AV, Bergagna HFJ, Chartier K, Basualdo JA (2010) Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquén, Patagonia Argentina. *Parasitol Int* 59: 626–628

Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of base nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512–526

Thompson RCA, McManus DP (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18: 452- 457

Varcasia A, Canu S, Lightowlers MW, Scala A, Garippa G (2006) Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitol Res* 98: 273–277

Figure 1.

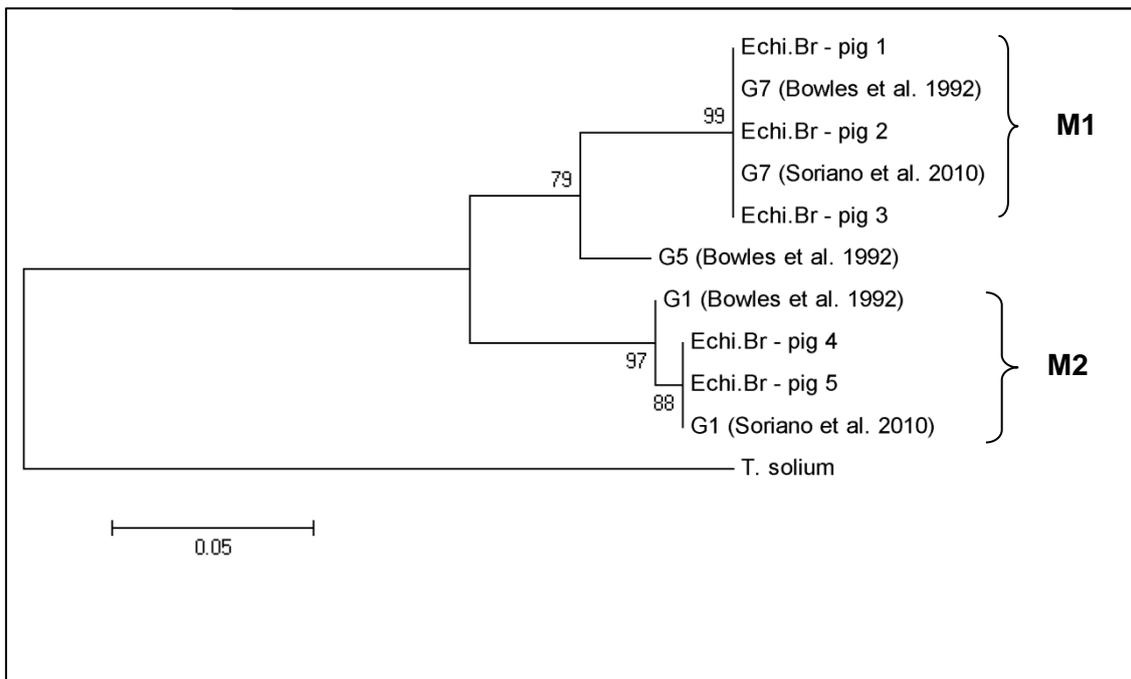


Fig.1 Neighbor Joining (NJ) tree based on *cytochrome c oxidase I gene (cox-I)*, for *Echinococcus* spp. isolates/genotypes. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA5.

5 DISCUSSÃO

O Rio Grande do Sul é o estado do Brasil com maior incidência de equinococose cística. Regiões de fronteira com Argentina e Uruguai, países considerados endêmicos, são as mais acometidas. Provavelmente, a contaminação se dá mais facilmente, devido à intensa atividade pecuária exercida na região (de la RUE, 2008). Balbinotti et al. (2012) e de la Rue et al. (2006, 2011) relatam a ocorrência de cisto hidático em ovinos, bovinos e humanos, abrangendo preferencialmente regiões do sul e sudoeste do RS.

Segundo de la Rue (2008) o *Echinococcus* está presente em uma área de aproximadamente 100.000 quilômetros quadrados, próximo às regiões de fronteira (Brasil – Argentina/Uruguai), supondo que municípios como: Santana do Livramento, Uruguiana, Dom Pedrito, entre outras, estejam potencialmente contaminados com o parasito, sendo, portanto, consideradas regiões endêmicas. No entanto, observa-se a ocorrência de focos da parasitose na região centro/norte do estado, abrangendo municípios como Arroio do Meio, Tupandi, Anta Gorda, entre outros, inferindo que o agente etiológico da equinococose pode estar amplamente distribuído no RS. Além disso, há carência de dados epidemiológicos que comprovem a distribuição geográfica do parasito, o que dificulta a profilaxia da doença.

Devido a não obrigatoriedade de relatos de casos de EC em humanos, poucos dados se tem acerca da doença (de la RUE, 2008). Conforme dados do DATASUS (Departamento de Informática do SUS) foram registrados 5 casos de EC em humanos no período de janeiro de 2008 a novembro de 2012 no RS, sendo que os municípios afetados incluem Canoas, Porto Alegre, São Jerônimo e São Sepé. Estes dados confirmam a ocorrência de casos de EC em regiões potencialmente não endêmicas do RS, com alguns focos da doença na região central, como visto neste estudo. Entretanto, segundo de la Rue (2008) poucos casos de EC são relatados em municípios próximos as regiões endêmicas. A maioria dos casos está próxima à região metropolitana, pois as oportunidades de trabalho induzem ao êxodo rural e pelo lento desenvolvimento do cisto hidático, o diagnóstico geralmente é feito depois de alguns anos.

A EC é considerada uma doença reemergente em vários países e regiões do mundo, devido a sua distribuição cosmopolita. Este fato é atribuído ao aumento de casos desta parasitose e uma redução nos programas de controle de zoonose, conduzindo a EC para uma doença grave com consideráveis perdas econômicas, sendo realmente um problema de saúde pública (JENKINS et al., 2005; MORO; SCHANTZ, 2009; GROSSO et al., 2012).

As propriedades suínolas, de onde foram coletadas as amostras de cistos, são provenientes da mesma região, a qual abrange municípios próximos a central de abates. Através da caracterização molecular, descobriu-se que além de *Echinococcus* spp. haviam cistos causados por *Taenia hydatigena* nas amostras analisadas. A morfologia, tanto do ovo, quanto da fase larvária do *Echinococcus* e da *T. hydatigena*, são semelhantes, levando a crer que a distribuição desses ovos no ambiente é feita da mesma forma (NEVES, 2005). Torgerson e Heath (2003) relatam a probabilidade de ovos de *T. hydatigena*, migrarem em torno de 40 km, com ajuda provavelmente de meios mecânicos, através das aves ou até mesmo pelo vento. Deste modo, sugere-se que a disseminação tanto de ovos de *Echinococcus* quanto de *T. hydatigena*, na região estudada, possa estar relacionada com a ajuda de insetos, tais como moscas, que ao pousarem nas fezes contaminadas do cão, possam carrear os ovos do parasito e assim contaminam o ambiente dos suínos.

O método utilizado para diagnóstico da EC, em HI, pela Inspeção de Sanitária, consiste principalmente no exame visual (macroscópico) dos animais abatidos, gerando dados equivalentes ao número de cistos hidáticos encontrados e conseqüentemente uma epidemiologia desta parasitose (BRASIL, 2012). Pela grande quantidade de amostras positivas para *T. hydatigena* encontradas neste estudo, sugerimos que a análise feita somente por macroscopia não seria o suficiente para identificação do *Echinococcus* em frigoríficos. A correta identificação do parasito é denotada pela observação de protoescoléces no líquido hidático ou análise molecular da parede do cisto (ECKERT et al., 2001; BALBINOTTI et al., 2012).

A ocorrência de *Echinococcus* spp. e *T. hydatigena* em suínos também foi relatada por Bruzinskait et al. (2009) na Lituânia, confirmando a preferência destes parasitos pelo mesmo hospedeiro. É importante ressaltar que a detecção da *T. hydatigena* em suínos, ou qualquer outro hospedeiro, é de grande importância, pois motiva o tratamento de cães nas propriedades afetadas, em regiões potencialmente

endêmicas, levando a diminuição dos prejuízos à indústria de carnes (TORGERSON; HEATH, 2003).

Os genótipos, dentro da espécie *Echinococcus granulosus sensu lato*, diferenciam-se gradativamente e transformam-se em linhagens cada vez mais distantes, afetando o padrão de ciclo de vida do parasito, assim como a especificidade do hospedeiro, a taxa de desenvolvimento, a patogenicidade, a dinâmica de transmissão, bem como a epidemiologia da doença, podendo assim, ser considerados espécies distintas. A identificação destes gêneros e espécies, presentes em cada região endêmica é crucial para o efetivo controle da EC (ECKERT et al., 2001; THOMPSON; MCMANUS 2002; THOMPSON, 2008). Diante disto, procurou-se definir os genótipos presente na região centro/norte do RS, a fim de identificar os métodos de controle desta doença.

Através de análises moleculares, identificou-se a ocorrência do *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) e *E. canadensis* (G7) em suínos no RS. Resultados semelhantes foram relatados por Sanchez et al. (2012) no Peru, Kamenetzky et al. (2002) na Argentina e Villalobos et al. (2007) no México, utilizando a mesma abordagem molecular, relataram a presença destes genótipos, também em suínos. Estes resultados confirmam a capacidade do suíno como hospedeiro intermediário de diferentes genótipos de *Echinococcus*, contribuindo para a disseminação da zoonose pelo estado do RS.

Para a análise molecular do *Echinococcus*, foram utilizadas as sequências que apresentaram melhor cromatograma. A árvore filogenética revelou a formação de dois grupos principais M1 e M2. O grupo M1 reuniu cinco sequências do genótipo G7, onde observa-se a nítida similaridade entre as amostras brasileiras (Echi.Br-pig1, Echi.Br-pig2, Echi.Br-pig3) e Argentina (G7) (SORIANO et al., 2010), comparado com a sequência de referência descrita por Bowles et al. (1992), representada pela Figura 1 - Manuscrito 2. Esta análise confirma que este genótipo está amplamente difundido entre os dois países, provavelmente através da migração de animais pela fronteira do Brasil com a Argentina.

Schneider et al. (2010) relatam a ocorrência de 23 casos de EC causadas pelo *E. canadensis* (G7) em humanos, demonstrando que esta cepa tem consideráveis riscos à saúde humana. A presença do genótipo G7 no RS traz preocupações acerca da sua infectabilidade, sendo que esta já foi descrita em

bovinos, demonstrando sua fácil adaptação em diferentes hospedeiros (BADARACO et al., 2008).

O grupo M2 compara sequências do genótipo G1 do Brasil (Echi.Br-pig4, Echi.Br-pig5), com a sequência G1 proveniente de ovino relatada por Soriano et al. (2010) da Argentina. A similaridade entre as sequências indica a probabilidade da cepa G1 ser conservada geneticamente em diferentes áreas geográficas. Estes dados confirmam que este genótipo pode adaptar-se aos diferentes HI, sendo altamente infeccioso tanto em animais, como em humanos. No Brasil, o genótipo G1 já foi anteriormente descrito em bovinos, ovinos, cães e humanos, sendo relatada neste estudo, em suínos, indicando que encontra-se, provavelmente, disseminada pelo estado do RS (de la RUE et al., 2006, 2011; BALBINOTTI et al., 2012). Breyer et al. (2004) na Bulgária e Soriano et al. (2010) na Argentina, também relatam a ocorrência da adaptação da cepa G1 ao suíno, confirmando os dados encontrados neste estudo. No entanto, Hobbs et al. (1990) sugerem, que o suíno pode ser considerado um hospedeiro acidental em regiões onde a cepa G1 predomina.

Segundo Moro et al. (2006) na América do Sul, os países que apresentam um maior número de notificações de equinococose cística em humanos são Chile, Peru e Argentina. No Brasil, dados epidemiológicos acerca da EC em humanos são escassos, já que não há notificação compulsória dos casos ocorridos (de la RUE, 2008). Assim, devido à falta de um controle da distribuição geográfica desta zoonose no RS, acredita-se que mais regiões do estado possam estar contaminadas.

A ocorrência de dois genótipos distintos (G1 e G7) poder estabelecer-se em suínos, leva a crer que este possa ser considerado um potencial hospedeiro de diferentes cepas de *Echinococcus* spp. e que o HD (cão) pode estar abrigando as duas linhagens. Casulli et al. (2012) sugerem que diferentes genótipos em um único HI, podem indiretamente, estar relacionado com o cruzamento entre parasitos adultos diferentes em um mesmo HD. Haag et al. (1999) relatam a possibilidade da fecundação cruzada entre os genótipos de *Echinococcus*, representando um caso de hibridação entre as cepas.

A constatação de que os suínos podem abrigar tanto *E. granulosus sensu stricto* (G1) quanto *E. canadensis* (G7) tem consideráveis implicações para a implementação de um programa de controle da EC, pois o período de maturação dos parasitos diferem de uma cepa para outra, sendo de 34 dias para a cepa G7 e de 45 dias para a cepa G1, dificultando o tratamento medicamentoso regular dos

cães (THOMPSON e MCMANUS 2002; MCMANUS; THOMPSON 2003). O cão, por ser o HD do *Echinococcus* spp., é o responsável por perpetuar o ciclo e disseminar os ovos do parasito. Portanto, é de extrema importância um tratamento efetivo dos mesmos, a fim de evitar a contaminação de humanos e animais (ECKERT et al., 2001). Segundo de la Rue (2008), medidas de controle e profilaxia da EC só seriam eficientes se englobassem: ações educativas para mudar as práticas humanas (alimentação de cães com vísceras cruas), o tratamento periódico dos cães e identificação fidedigna da EC junto a frigoríficos.

Estudos futuros incluindo maior número de amostras oriundas tanto de suínos como de outros hospedeiros, serão úteis no esclarecimento da evolução da equinococose cística no RS. Ao mesmo tempo, auxiliará na compreensão das estratégias evolutivas de cada genótipo, as quais o tornam capazes de invadir e adaptar-se a diferentes hospedeiros, disseminando-se pelo sul do Brasil. Uma monitorização constante e uma rigorosa identificação de cistos hidáticos, poderiam evitar resultados incorretos, e auxiliariam na profilaxia da EC, ainda pouco difundida no estado do RS.

Diante das constatações obtidas neste estudo foi possível reconhecer que o suíno representa um potencial hospedeiro intermediário para o *Echinococcus* spp. na região centro/norte do RS. Tendo em vista que este hospedeiro nunca havia sido estudado no Brasil, foi possível verificar que mais de um genótipo de *Echinococcus* circula entre os suínos, confirmando a capacidade deste HI em ser infectado tanto por G1 quanto por G7. Portanto, pesquisas complementares deverão ser realizadas, a fim de evidenciar a importância do genótipo G7 em humanos, sendo que estes estudos são indispensáveis para profilaxia e controle desta zoonose no estado do Rio Grande do Sul.

6 CONCLUSÃO

- Existem focos da equinococose cística na região centro/norte do Rio Grande do Sul;
- A identificação do cisto hidático não poderá ser realizada somente pela análise macroscópica, pois outros cestódeos possuem uma morfologia do cisto bastante semelhante, podendo induzir ao erro de diagnóstico da EC.
- *Taenia hydatigena* está presente em vísceras suínas na região estudada, acarretando diversos danos à indústria de carnes;
- O suíno foi caracterizado como um hospedeiro intermediário do *Echinococcus* spp. no Rio Grande do Sul;
- Identificou-se dois genótipos presentes nas amostras de vísceras suínas analisadas, caracterizadas molecularmente em *Echinococcus granulosus sensu stricto* cepa G1 e *Echinococcus canadensis* cepa G7.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACSURS. Associação dos Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul. 2010. Disponível em: <<http://www.acsurs.com.br>>. Acesso em: 15 set. 2012.

ALMEIDA, F. et al. Echinococcus granulosus. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 11, p. 1-6, 2008.

ALMEIDA, S. C. X. et al. Hidatidose Pulmonar Policística Mimetizando Lesões Metastáticas: Relato de Caso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 261-263, 1997.

ANDRESIUK, M.V. *Echinococcus granulosus*: biological comparison of cattle isolates from endemic regions of Argentina and Spain. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 41, p. 218-225, 2009.

AMORIM, D.S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2002. 136 p.

ARGENTINA. Ministerio de Salud de la Nación - Guia Enfermedades Infecciosas Hidatidosis, n.11, 2012. Disponível em: <<http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-medica-hidatidosis.pdf>>. Acesso em: 12 de dez. 2012.

ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure. Editora UNESC, Criciúma, 2003

AVISE, J.C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Sunderland: Chapman & Hall, 2nd ed. 2004. 667p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Defesa e Inspeção Agropecuária. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf>. Acesso em: 16 de dez. 2012.

BADARACO, J.L. **Caracterização do polimorfismo de *Echinococcus granulosus* em dois genes nucleares e um mitocondrial: evidências de introgressão**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BADARACO, J.L. et al. Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 453–459, 2008.

BALBINOTTI, H. et al. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.188, p. 255– 260, 2012.

BART, J. M. et al. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. **Parasitology Research**, v. 98, n. 2, p. 130-137, 2006.

BREYER, I. et al. *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. **Parasitology Research**, v. 93, n.2, p. 127-30, 2004.

BRUZINSKAITE, R. et al. Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 237–241, 2009.

BOWLES, J.; BLAIR, D.; MCMANUS, D. P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 54, n. 2, p. 165-174, 1992.

BOWLES, J.; MCMANUS, D. P. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. **International Journal for Parasitology**, v. 23, n. 7, p. 969-972, 1993.

CABRERA, P.A. et al. Transmission Dynamics of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* in sheeps in Uruguay. **International Journal of Parasitology**. v.25, n. 7, p. 807-813, 1995.

CASULLI, A. et al. Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. **Infection, Genetics and Evolution**. v.12, p. 377–383, 2012.

CISPOA - Coordenadoria de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal, RS. Dados CISPOA 2010. Disponível em: <<http://www2.agricultura.rs.gov.br/servicos.php?cod=66>>. Acesso em: 18 de dez. 2012.

COX, M.M.; DOUDNA, J.A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular Princípios e Técnicas**. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda. 2011. 283-284p.

CRUZ-REYES, A. et al. *Echinococcus granulosus* from Mexican pigs is the same strain as that in Polish pigs. **Journal of Helminthology**, v. 81, n. 3, p. 287-292, 2007.

DATASUS – Departamento de informática do SUS (2012). Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS>>. Acesso em 18 de dez. 2012.

DE LA RUE, M. L. et al. New data on *Echinococcus* spp. In Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 103-104, 2006.

DE LA RUE, M. L. Cystic Echinococcosis in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 53-56, 2008.

DE LA RUE, M. L. et al. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 97-103, 2011.

DINKEL, A. et al. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus* -complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. **International Journal for Parasitology**, v.34, p. 645-653, 2004.

ECKERT, J. et al. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. **World Organisation for Animal Health**, Paris, v. 1, p. 1-264, 2001.

ECKERT, J., THOMPSON, R.C.A. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. **Acta Tropica**, v.64, p.19–34, 1997.

FARIAS, L.N. et al. Echinococcosis In Southern Brazil: Efforts Toward Implementation Of A Control Program In Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 46, n. 3, p.153-156, 2004.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. São Paulo, 2004, Ed. Ícone, v. 2, p. 453-469.

GAUCI, C. et al. Hydatid disease: vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. **Expert Review Vaccines**, v.4, p. 103-112, 2005

GONZÁLEZ S. et al. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* Antigen B. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, p.3979–83, 2000.

GRAICHEN, D.A.S. **Antígeno B de *Echinococcus***: Instabilidade genômica, variação no verme adulto e anticorpos policlonais. 2011. 159f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)– Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GROSSO, G. et al. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. **World Journal Gastroenterology**, v. 18, n. 13, p. 1425-1437, 2012.

HAAG, K.L. et al. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (cestoda: Taeniidae): selfing or outcrossing? **Parasitology**, v. 118, p. 63-71, 1999.

HOFFMANN, A. N.; MALGOR, R.; DE LA RUE, M.L. Prevalência de *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) em cães urbanos errantes do município de Dom Pedrito (RS), Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p.843-847, 2001.

HÜTTNER, M. et al. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis*, Ortlepp, 1937 (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 7, p. 861-868, 2008.

HOBBS, R.P.; LYMBER, J.; THOMPSON, R.C.A. Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian hosts, and its implications for strain recognition. **Parasitology**, v. 101, p. 273–281, 1990.

JENKINS, D.J.; ROMIG, T.; THOMPSON, R.C.A. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.—a global update. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1205–1219, 2005.

KAMENETZKY, L. et al. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, n. 2, p. 129-136, 2002.

KNAPP, J. et al. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): An inference from nuclear protein-coding genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, p. 628–638, 2011.

KEDRA, A.H. et al. Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. **Acta Parasitology**, v. 44, p. 248–254.1999.

KLOETZEL, K.; PEREIRA, J.A. Human hydatidosis in Rio Grande do Sul (Brazil) na estimat of its significance for the public health of the country. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 3, n. 6, p 549-555, 1992.

LAVIKAINEN, A. et al. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. **Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 207-215, 2003.

LIGHTOWLERS MW, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. **Parasite Immunology**, v.18, p. 457– 62, 1996.

LIGHTOWLERS, M.W.; GAUCI, C.G. Vaccines against cysticercosis and hydatidosis. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.337– 52, 2001.

MARDINI, L.B.F.; SOUZA, M.A.T. - Programa de Controle da Hidatidose humana no estado do Rio Grande do Sul. **Bol. Hidat.** 1998-1999, p. 39-43, 1999.

MCMANUS, D.P.; THOMPSON, R.C.A. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. **Parasitology**, v. 127, p. 37–51, 2003.

MIYAKI, C.Y. et al. **Reconstrução Filogenética**. Introdução e o Método da Máxima Parcimônia. In: MATIOLI, S.R. (Ed). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto; Holos Editora. 2001.p.97-107.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. São Paulo, 2011, Ed. Roca, p.53.

MOKS, E. et al. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 647-654, 2008.

MOREIRA, R. K. et al. Cisto Hidático Pulmonar Gigante – Relato De Um Caso. **Radiologia Brasileira**, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 175-176, 2001.

MORO, P.; SCHANTZ, P.M. Cystic echinococcosis in the Americas. **Parasitology International**, v. 55, p. 181–186, 2006.

MORO, P.; SCHANTZ, P.M. Echinococcosis: a review. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 13, p. 125—133, 2009.

MORO, P. et al. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. **Parasitology International**, v. 58, p.184–186, 2009.

NAKAO, M. et al. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. **Parasitology**, v. 134, n. 5, p. 713-722, 2007.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. São Paulo, 2005, Ed. Atheneu, v. 11, p. 239-246.

OIE - World Organization for Animal Health. Institute for International Cooperation in Animal Biologics, [on line] OIE, 2011, Echinococcosis. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf>>. Acesso em: 01 de setembro de 2011.

PASTORE, R. et al. Inquérito sorológico da infecção pelo *Echinococcus* sp no município de Sena Madureira, AC. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 473-477, 2003.

PAWŁOWSKI, Z.; STEFANIAK, J. The pig strain of *Echinococcus granulosus* in humans: a neglected issue? **Trends in Parasitology**, v.19, n.10, 2003.

REGERT, J. **Alternativas para tratamento para a Equinococose Cística**. 2008. 75f. Monografia (Título de Farmacêutico)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro. Ed.Guanabara Koogan, v. 2, p. 447-460, 1991.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

ROSENZVIT, M. C. et al. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. **Parasitology**, v. 118, n. 5, p. 523-530, 1999.

ROMIG, T. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg*. v. 388, p.209–217, 2003.

SAARMA, U. et al. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. **Parasitology**, v. 136, p. 317–328, 2009.

SANTOS, D. V. et al. Análise das principais lesões encontradas nos abatedouros registrados na CISPOA. Informativo Técnico, n. 4, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.crmvrs.gov.br/409DPA.pdf>>. Acesso em: 02 de ago 2011.

SÁNCHEZ, E. et al. *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from an endemic region in Peru. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 2, p. 275-278, 2012.

SARKUNAS, M. et al. *Echinococcus granulosus* ('pig strain', G6/7) in Southwestern Lithuania. **Acta Veterinaria**, v. 52, p. 1-14, 2010.

SHARBATKHORI, M. et al. Genetic categorization of *Echinococcus granulosus* from humans and herbivorous hosts in Iran using an integrated mutation scanning-phylogenetic approach. **Electrophoresis**, v. 30, p. 2648–2655, 2009.

SHAHNAZI, M. et al. Molecular characterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolates in Isfahan, Iran. **Acta Tropica**, v. 117, p. 47–50, 2011.

SHENEIDER, H. **Métodos de Análise Filogenética um guia prático**. Ribeirão Preto: Holos Editora. 2001. p.130-136.

SCHNEIDER, R. et al. *Echinococcus canadensis* G7 (Pig Strain): An Underestimated Cause of Cystic Echinococcosis in Austria. **American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 82, n. 5, p. 871–874, 2010.

SILVA, A. M.; CALDEIRA, J.; NUNES, J. L. P.A.I.R. – Alternativa terapêutica do quisto hidático no fígado. **Faculdade de Ciências Médicas de Nova Lisboa, Lisboa**. Portugal, 2001.

ŠNÁBEL, V. et al. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. **Parasitology Research**, v. 105, n. 1, p. 145-154, 2009.

SORIANO, S.V. et al. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquén, Patagonia, Argentina. **Parasitology International**, v. 59, p. 626–628, 2010.

THOMPSON, R. C. A. et al. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. **Parasitology**, v. 132, n. 3, p. 439-447, 2006.

THOMPSON, R. C. A. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. **Experimental Parasitology**, v.119, n. 4, p. 439-446, 2008.

THOMPSON, R.C.A. & MCMANUS, D.P.- Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. **Trends in Parasitology**, 18(10) 452-457, 2002.

TORGERSON, P.R.; HEATH, D.D. Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. **Parasitology**, v. 127, p. 143–158, 2003.

TORGERSON, P.R. Mathematical models for the control of cystic echinococcosis. **Parasitology International**, v.55, p. 253 – 258, 2006.

TORGERSON, P.R.; MACPHERSON, C.N.L. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 79– 95, 2011.

VARCASIA, A. et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. **Parasitology Research**, v. 101, p.1135–1139, 2007.

VIRGINIO, V.G. et al. Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. **Molecular e Biochemical Parasitology**, v. 183, p. 15– 22, 2012.

VIRGINIO, V.G. et al. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. **Clinical Experimental Immunology**, v.132, p. 309–315, 2003.

VILLALOBOS, N. et al. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p.185–189, 2007.

XIÃO, N. et al. Short report: identification of *Echinococcus* species from a yak in the qinghai-tibet plateau region of china. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 445-446, 2003.