

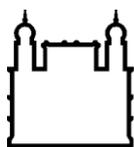
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde
Doutorado

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Echinococcus vogeli* NA AMAZÔNIA OCIDENTAL
BRASILEIRA E PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
IMUNODIAGNÓSTICO PARA A EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA HUMANA,
BASEADO EM ANTÍGENOS RECOMBINANTES

DANIEL DAIPERT GARCIA

Rio de Janeiro
Setembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

DANIEL DAIPERT GARCIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Echinococcus vogeli* NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL BRASILEIRA E PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO IMUNODIAGNÓSTICO PARA A EQUINOCOCOSE
POLICÍSTICA HUMANA, BASEADO EM ANTÍGENOS
RECOMBINANTES**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biodiversidade e saúde.

Orientador (es): Prof. Dr. Rosângela Rodrigues e Silva
Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

RIO DE JANEIRO

Setembro de 2019

Daipert Garcia, Daniel.

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Echinococcus vogeli* NA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA E PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO IMUNODIAGNÓSTICO PARA A EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA HUMANA, BASEADO EM ANTÍGENOS RECOMBINANTES / Daniel Daipert Garcia. - Rio de janeiro, 2019.

113 f.; il.

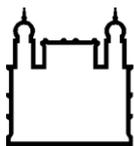
Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2019.

Orientador: Rosângela Rodrigues e Silva.

Co-orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.

Bibliografia: f. 70-88

1. *Echinococcus vogeli*. 2. Diversidade genética. 3. Equinococose policística . 4. Imunodiagnóstico. 5. Antígenos Recombinantes. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AUTOR: Daniel Daipert Garcia

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Echinococcus vogeli* NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL BRASILEIRA E PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
IMUNODIAGNÓSTICO PARA A EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA HUMANA,
BASEADO EM ANTÍGENOS RECOMBINANTES

ORIENTADORES: Prof. Dr. Rosângela Rodrigues e Silva

Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior - Presidente - (Instituto Oswaldo Cruz)

Profa. Dra. Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior (Universidade Federal Fluminense)

Profa. Dra. Daniela Leles de Souza (Universidade Federal Fluminense)

Profa. Dr. Simone Chincz Cohen (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Fabiano Matos Vieira (Instituto Oswaldo Cruz)

Rio de Janeiro, 27 de setembro de 2019

Dedico este estudo aos meus pais, que me proporcionaram todas as oportunidades pra chegar até aqui, somente as aproveitei da melhor forma que consegui. São doutores da vida e me proporcionaram tudo de valoroso e importante que não tiveram. Todo o esforço de vocês não foi em vão, e eu valorizo isso a todo instante da minha vida. Obrigado por tudo, só nós sabemos o caminho que vocês precisaram percorrer para que eu pudesse estar aqui. Amo vocês, serão sempre meus super-heróis.

Agradecimentos

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto Oswaldo Cruz e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde, por me proporcionarem o contato com o conhecimento científico com um corpo docente e uma gestão acadêmica brilhantes.

Aos meus orientadores Dra. Rosângela Rodrigues e Silva e Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela confiança irrestrita, pelo aceite da difícil tarefa de orientar e por toda a dedicação, paciência e sabedoria com que nortearam com maestria meus passos na execução desse trabalho, dando rumo às minhas ideias e ações. E agradeço também à amizade que construímos através desse processo e de outros, vocês serão sempre um exemplo para mim, muito obrigado.

Ao Dr. Nilton Ghiotti de Siqueira, pela ajuda essencial na obtenção das amostras humanas utilizadas nesse estudo.

Ao Dr. Márcio Pavan e à Dra. Veridiana Virgínio, por todo apoio técnico e metodológico, análise e parceria na obtenção das melhores respostas para minhas perguntas e hipóteses. A ambos também agradeço a amizade construída nesse processo, vocês foram indispensáveis, e espero que estejamos juntos diversas outras vezes, dentro e fora do âmbito científico.

Aos pesquisadores e demais amigos do Laboratório de Helminhos Parasitos de Vertebrados, por toda a ajuda na parte de obtenção de amostras e na troca de conhecimento, experiências e amizade no dia a dia, em especial aos amigos Fernanda Almeida, Leandro Neves, Fernanda Bittencourt, Simone Mendes, Jessica Assis e Tuan Correia.

Aos amigos Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por todo acolhimento, amizade e ajuda na parte metodológica deste trabalho.

À Samantha Xavier, pesquisadora do Instituto Oswaldo Cruz, pela ajuda na construção do mapa.

Ao Serviço de Produção e Tratamento de Imagem – IOC – Fiocruz, pela ajuda na otimização da qualidade das fotos e esquemas.

À minha esposa Andréia, pelo amor, paciência, compreensão, estímulo e amizade. Obrigado por todo companheirismo e apoio em todos os momentos, mas principalmente nos momentos difíceis que passei no meio desse processo, e por ser a mãe da nossa filha, o melhor presente que você e a vida poderiam me dar.

À minha filha Helena, sol da minha vida, ápice do conceito de felicidade, luz dos meus dias, obrigado por ser essa filha tão maravilhosa e contagiar a todos com sua alegria e sua energia.

Aos meus pais Antônio Jorge Garcia e Leila Maria Garcia, que com muito amor lutaram arduamente para que eu pudesse seguir esse caminho, sem vocês meus esforços desde sempre teriam sido em vão.

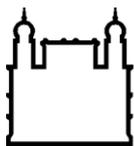
Aos meus avós Henrique Daipert, Leonilda Alves e Therezinha Garcia, por todo amor incondicional que fizeram transbordar sobre mim enquanto estavam conosco.

A todos os meus amigos, que trazem leveza para minha vida e que me ajudam a passar por todos os desafios que a vida nos impõe.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação” (Simone de Beauvoir).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

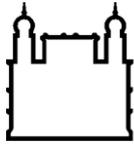
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *ECHINOCOCCUS VOGELI* NA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA E PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO IMUNODIAGNÓSTICO PARA A EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA HUMANA, BASEADO EM ANTÍGENOS RECOMBINANTES

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

RESUMO

A equinococose policística humana (EP) é uma infecção parasitária causada pelo estágio larval de *Echinococcus vogeli*, que ocorre em áreas rurais e silvestres da América Central e do Sul. No entanto, pouca informação sobre a variabilidade genética de *E. vogeli* está disponível. Neste estudo, 32 amostras de cistos de *E. vogeli* excisados do fígado ou do mesentério de pacientes humanos tiveram uma seqüência de 396-pb do gene mitocondrial da citocromo oxidase 1 (*cox1*) sequenciada e comparada com outras 17 seqüências de *cox1* representando 9 espécies de *Echinococcus*. Uma árvore Bayesiana revelou que todas as seqüências de *E. vogeli* formaram um clado monofilético e bem suportado com uma seqüência de referência de *E. vogeli*. A ocorrência de haplótipos de *E. vogeli* geograficamente restritos sugere retenção de polimorfismos ancestrais com pouca migração no Acre, Brasil. Além disso, dois antígenos recombinantes (rAgB8/1 e rAgB8/2), correspondentes a subunidades do antígeno B (AgB) de *E. granulosus* e previamente caracterizados como de valor diagnóstico para a equinococose cística (EC) foram validados para o diagnóstico da EP. Estes antígenos apresentaram bom desempenho em ELISA para a detecção de anticorpos (IgG totais) específicos em soros de pacientes com EP, sendo potenciais substitutos para preparações antigênicas brutas derivadas de fluido hidático ou AgB nativo purificado.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ECHINOCOCCUS VOGELI ISOLATES AND STANDARDIZATION AND VALIDATION OF IMMUNODIAGNOSTIC METHOD FOR HUMAN POLYCYSTIC EQUINOCOCOSIS, BASED ON RECOMBINANT ANTIGENS

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Human polycystic echinococcosis (EP) is a parasitic infection caused by the larval stage of *Echinococcus vogeli*, which occurs in rural areas of Central and South America. However, little information on the genetic variability of *E. vogeli* is available. In this study, 32 excised *E. vogeli* cyst samples from human patients had a 396-bp sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase 1 (*cox1*) gene sequenced and compared with 17 other *cox1* sequences representing nine *Echinococcus* species. A Bayesian tree revealed that all *E. vogeli* sequences formed a well-supported monophyletic clade with an *E. vogeli* reference sequence. The occurrence of geographically restricted *E. vogeli* haplotypes suggests retention of ancestral polymorphisms with little migration in Acre, Brazil. In addition, two recombinant antigens (rAgB8/1 and rAgB8/2), corresponding to *E. granulosus* antigen B (AgB) subunits and previously characterized as diagnostic value for EC were validated for the diagnosis of EP. These antigens performed well in ELISA for the detection of specific antibodies (total IgG) in sera from EP patients and are potential substitutes for crude antigenic preparations derived from hydatid fluid or purified native AgB.

Índice

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Aspectos gerais.....	1
1.2. Equinococoses.....	3
1.3. <i>Echinococcus vogeli</i> e a equinococose policística.....	4
1.3.1. Ciclo de vida.....	4
1.3.2. Morfologia de <i>E. vogeli</i>	6
1.3.3. Epidemiologia.....	10
1.3.4. Aspectos clínicos.....	11
1.3.5. Imunobiologia da infecção.....	12
1.3.6. Diagnóstico.....	13
1.3.6.1. Achados laboratoriais.....	14
1.3.6.2. Diagnóstico por imagem.....	14
1.3.6.3. Testes sorológicos em seres humanos.....	15
1.3.6.4. Antígenos utilizados no imunodiagnóstico de equinococoses.....	17
1.3.6.5. Diagnóstico molecular.....	20
1.4. Tratamento e prevenção de equinococoses.....	21
1.5. Estratégias para prevenção e controle de equinococoses.....	24
2. Justificativa.....	25
3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. Material e Métodos.....	28
4.1. Caracterização molecular de isolados de <i>E. vogeli</i>	28
4.1.1. Obtenção de amostras de cistos hidáticos.....	28
4.1.2. Processamento das amostras para extração de DNA.....	29
4.1.3. Amplificação de sequências de <i>cox1</i> a partir de isolados de <i>E. Vogeli</i> ...30	
4.1.4. Análise <i>in silico</i> de sequências de DNA.....	32
4.2. Padronização e validação do teste imunoenzimático.....	33

4.2.1. Obtenção de amostras.....	33
4.2.2. Clonagem, expressão e purificação dos antígenos recombinantes rAgB8/1 e rAgB8/2.....	34
4.2.3. Ensaio imunoenzimático (enzyme linked immunosorbent assay [ELISA]).....	34
4.2.4. Determinação de variações intra-ensaio e interensaios.....	35
4.2.5. Análises estatísticas.....	36
5. Resultados.....	37
Capítulo I.....	37
Capítulo II.....	53
5.1. Padronização e validação de método imunodiagnóstico para a EP.....	54
6. Discussão.....	59
7. Conclusão.....	69
8. Referências.....	70
9. Anexos.....	89
Anexo I.....	89
Anexo II.....	91
Anexo III.....	95

Índice de Figuras

Figura 1 - Ciclo biológico natural do <i>E. vogeli</i>	4
Figura 2 - <i>Speothos venaticus</i> , hospedeiro definitivo natural de <i>Echinococcus vogeli</i>	5
Figura 3 - <i>Cuniculus paca</i> , hospedeiro intermediário do <i>Echinococcus vogeli</i> ...	5
Figura 4 - Representação esquemática do verme adulto de <i>E. vogeli</i>	7
Figura 5 – Cisto hidático.....	8
Figura 6 - Visão geral de um fígado humano infectado por <i>Echinococcus vogeli</i>	11
Figura 7: Mapa do Estado do Acre com a procedência dos pacientes que tiveram os cistos cirurgicamente excisados.....	29
Figura 8. Curvas ROC utilizadas para determinar os valores de <i>cut-off</i> e as áreas sob curva para os dois antígenos recombinantes testados em IgG ELISA.....	55
Figura 9. Gráficos representativos dos ELISAs com soros de pacientes com EP (quadrados) e de indivíduos saudáveis (círculos) frente aos antígeno rAgB8\1 (A) e rAgB8/2 (B).....	55

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Reagentes, concentrações e volumes utilizados na PCR para o gene <i>cox 1</i>	30
Tabela 2 - Condições térmicas utilizadas na PCR para o gene <i>cox 1</i>	31
Tabela 3 - Resumo dos parâmetros derivados das curvas ROC dos antígenos recombinantes testados em ELISA contra soros de pacientes positivos para EP e de indivíduos saudáveis.....	56
Tabela 4 – Coeficientes de variação intra-ensaio.....	57
Tabela 5 – Coeficientes de variação inter-ensaio.....	57
Tabela 6 - Resumo da especificidade de soros positivos para outras parasitoses obtidas em Elisa IgG contra os antígenos recombinantes AgB8/1 e AgB8/2.....	58

Lista de siglas e abreviaturas

Ag5	Antígeno 5
AgB	Antígeno B
Arc 5	<i>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein 5</i>
ASC	Área sob a curva ROC
BL21	<i>Bertani Lauria 21</i>
Blotto	<i>Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CVIAE	Coeficiente de variação intra-ensaio
CVIEE	Coeficiente de variação inter-ensaio
<i>cox 1</i>	Gene Citocromo c oxidase – subunidade 1
CO1	Citocromo c-oxidase (proteína)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
EA	Equinococose alveolar
EC	Equinococose cística
EP	Equinococose policística
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ESS	Tamanhos amostrais efetivos
FUNDHACRE	Fundação Hospital Estadual do Acre
GST	Glutathione-S-transferase
HD	Diversidade haplotípica
IC	Intervalo de confiança
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INCQS	Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde

IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LHPV	Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados
LRNH	Laboratório de Referência Nacional em Hidatidose
M	Molar
MCMC	Algoritmos de Monte Carlo via <i>Cadeias</i> de Markov
min	minutos
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<i>Nad1</i>	Gene NADH Desidrogenase
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NH	Número de haplótipos
OPD	Orto-Fenileno-Diamina
PAIR	<i>Puncture, aspiration, injection, re-aspiration</i>
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PSEx	Antígenos tegumentares de protoescólex
RAgB	Antígeno B recombinante
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
S	Sítios segregantes
s.l.	Senso latu
s.s.	Senso stricto
spp.	Espécies
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th	<i>T helper</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

π	Diversidade nucleotídica
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Ácido cítrico
cm	Centímetro(s)
h	Hora(s)
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
kDa	Quilodaltons
MgCl_2	Cloreto de magnésio
μL	Microlitro(s)
mL	Mililitro(s)
μm	Micrômetro(s)
mm	Milímetro(s)
μM	Micromolar
Mm	Milimolar
Mg	Miligrama(s)
N	Normal
nm	Nanômetro(s)
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
ng	Nanograma(s)
pmol	Picomole(s)
pb	Pares de bases
%	Porcentagem
q.s.p./	Quantidade suficiente para
U	Unidades

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais

As doenças parasitárias são caracterizadas por seu grande potencial infectante, podendo ser causadas por protozoários ou metazoários (cestóides, trematódeos, nematóides e artrópodes). São doenças que ocorrem no mundo todo, com grande prevalência em países com precariedade de condições socioeconômicas, sanitárias, educacionais e culturais, condições estas que favorecem o aparecimento, a evolução e a persistência de parasitoses intestinais e teciduais. No Brasil, apesar das melhoras significativas das condições sanitárias observadas nas últimas décadas, ainda encontramos várias parasitoses com altas taxas de prevalência, principalmente em áreas menos desenvolvidas. O tamanho continental do país contribui para que possamos encontrar áreas altamente desenvolvidas em contraste com áreas bastante pobres (Gazzinelli et al., 2012).

Dentre esses parasitos, destacam-se os platelmintos pertencentes à classe Cestoda, especialmente aqueles da família Taeniidae, como causadores de doenças em seres humanos. Em revisão taxonômica, Nakao et al. (2013) definiram que a família Taeniidae consiste dos gêneros *Taenia*, *Echinococcus*, *Hydatigera* e *Versteria*. Também foi demonstrado, através de estudos filogenéticos baseados em sequências de DNA nuclear, que os membros do gênero *Echinococcus* possuem estreitas relações genéticas entre si, sugerindo que o gênero faz parte de um jovem grupo evolutivo, no qual a especiação e a radiação global ocorreram recente e rapidamente (Lymbery, 2017).

Uma estimativa de eventos de especiação dentro da família Taeniidae usando ferramentas moleculares sugeriu que o gênero *Echinococcus* teria divergido do gênero *Taenia* há aproximadamente 16 milhões de anos e que a radiação dentro do gênero *Echinococcus* teria sido iniciada há aproximadamente 6 milhões de anos através do ancestral de todas as espécies deste gênero (Knapp et al., 2011). Além disso, acredita-se que a introdução de espécies de *Echinococcus* na Região Norte brasileira deveu-se à migração de canídeos hospedeiros, provenientes da América Central, durante o pleistoceno (Nakao et al., 2007).

Historicamente existe muita controvérsia sobre a classificação taxonômica do gênero *Echinococcus*. Com base principalmente nas características específicas da relação parasito-hospedeiro, muitas espécies e subespécies deste gênero foram descritas originalmente. No entanto, a maioria desses táxons foram considerados sinônimos para *Echinococcus granulosus* e revisões taxonômicas subsequentes passaram a reconhecer somente quatro espécies válidas: *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786), *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, *Echinococcus oligarthra* (Diesing, 1863) e *Echinococcus vogeli* Rausch & Bernstein, 1972.

Nas últimas décadas, no entanto, diversas ferramentas de pesquisa foram surgindo e a validade das espécies do gênero *Echinococcus* tem sido discutida e revisada constantemente. Uma das abordagens mais utilizadas para investigar os níveis de divergência entre os táxons tem sido por meio de árvores filogenéticas. Vários estudos construíram árvores filogenéticas para o gênero *Echinococcus*, baseadas tanto em sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) quanto de DNA nuclear (Bowles et al. 1995; Thompson & Lymbery, 1995; Nakao et al. 2007, 2010; Moks et al. 2008; Knapp et al. 2011; Sharma et al. 2013).

Dois estudos pioneiros da taxonomia molecular de *Echinococcus* spp. (Bowles et al. 1992; Bowles & McManus, 1993) mantiveram a nomenclatura das quatro espécies originalmente descritas para o gênero e definiram genótipos de G1 a G8 para *E. granulosus*. Estes estudos se basearam principalmente nas variações das sequências parciais de mtDNA, correspondentes aos genes da subunidade 1 da citocromo oxidase (*cox1*) e da subunidade 1 da NADH desidrogenase (*nad1*). Estes genótipos foram classificados correspondendo às seguintes linhagens biológicas: G1 (linhagem de ovelha), G2 (linhagem de ovelha tasmaniana), G3 (linhagem de búfalo), G4 (linhagem de cavalo), G5 (linhagem de gado), G6 (linhagem de camelo), G7 (linhagem de porco) e G8 (linhagem de cervídeos). Posteriormente os genótipos G9 (linhagem não identificada) e G10 (outra linhagem de cervídeos) foram sugeridos (Scott et al., 1997; Lavikainen et al., 2003).

Baseados em estudos moleculares aliados a outros parâmetros, muitos debates acontecem em torno da taxonomia do gênero *Echinococcus*, no entanto, em revisão recente, Lymbery (2017) reafirma a existência de 9 espécies dentro do

gênero *Echinococcus*, sendo elas: *E. granulosus* sensu stricto (s.s.), *Echinococcus canadensis* Schneider et al., 2010, *Echinococcus felidis* Ortlepp, 1937, *Echinococcus equinus* Schneider et al., 2010, *Echinococcus ortleppi* Schneider et al., 2010, *E. multilocularis*, *Echinococcus shiquicus* Xiao et al., 2005, *E. vogeli* e *E. oligarthra*.

1.2. Equinococoses

As equinococoses são antroponozoonoses parasitárias incluídas na lista de doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (Giri & Parija, 2012). São causadas pelo estágio larval (metacéstódeo) de parasitos pertencentes ao gênero *Echinococcus*, que infectam seres humanos e outros mamíferos. Seis espécies são consideradas de importância para a saúde humana, sendo elas: *E. oligarthra*, que causa a equinococose unicística; *E. vogeli*, que causa a equinococose policística (EP); *E. multilocularis*; que causa a equinococose alveolar (EA); e *E. granulosus* (s.s.), *E. equinus* e *E. ortleppi*, que causam a equinococose cística (EC) (Eckert & Thompson, 2017).

Duas formas desta doença são encontradas no Brasil, a EC no Sul (Deplazes et al., 2017) e a EP no Norte (Bittencourt-Oliveira et al., 2018). Na EC, o metacéstódeo se desenvolve em uma única vesícula, denominada cisto hidático, que é coberta por uma camada laminada que pode atingir vários milímetros de espessura. Este modo de desenvolvimento é denominado unilocular (Brehm & Coziol 2017). Já os metacéstóides na EP desenvolvem uma forma policística, uma vez que os cistos são caracterizados pela divisão interna para formar massas císticas multicamadas. Eles crescem como um ou vários cistos localizados mais frequentemente no fígado e nos pulmões dos hospedeiros intermediários (Thompson 2017).

1.3. *Echinococcus vogeli* e a equinococose policística

1.3.1. Ciclo de vida

Assim como todos os cestóides tenídeos, as espécies de *Echinococcus* exploram a relação predador-presa para a manutenção de seus ciclos de vida, possuindo ciclo biológico (figura 1) do tipo heteroxeno, ou seja, requerem dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida. Os hospedeiros definitivos do *E. vogeli* são o cão selvagem (*Speothos venaticus*) (Figura 2), conhecido popularmente como cachorro-do-mato-vinagre, ou o cão doméstico (*Canis familiaris*). O *S. venaticus* é um canídeo nativo da América latina, onde habita florestas e pantanais entre o Panamá e o norte da Argentina. São animais terrestres, mas com grande capacidade de nadar e mergulhar (Rodrigues-Silva et al., 2002; Romig et al., 2017).

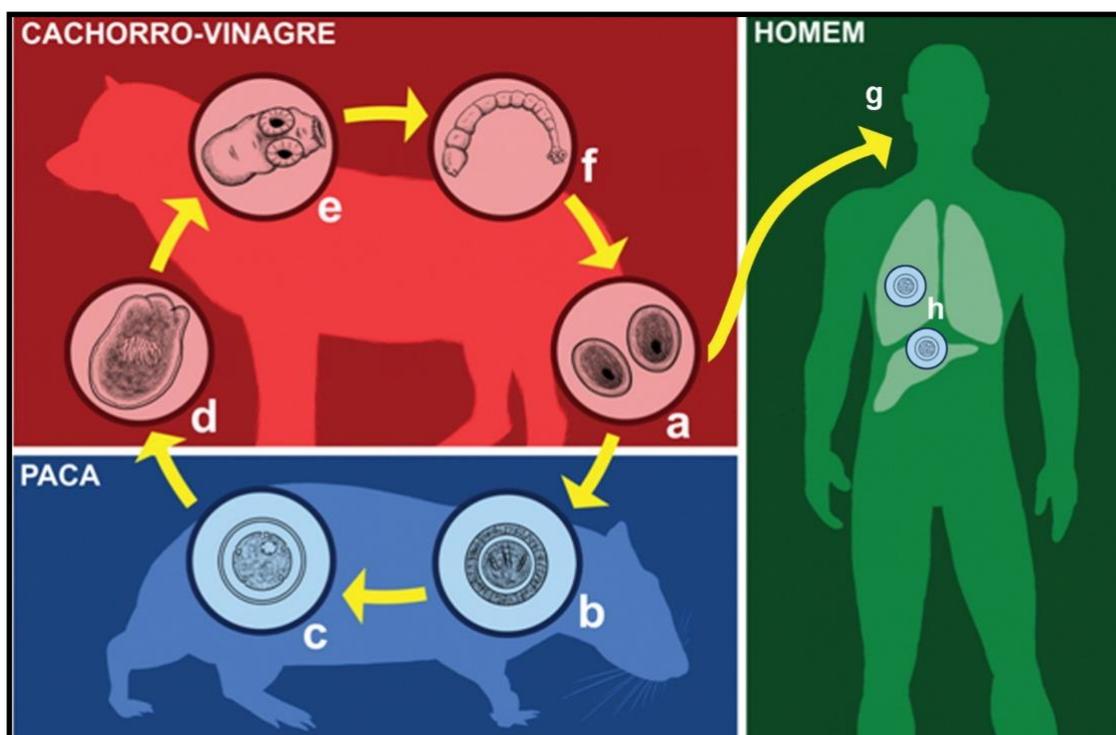


Figura 1 - Ciclo biológico natural do *E. vogeli*. Legenda: a- ovos; b- ovos ingeridos pela paca; c- metacestóide; d- ingestão de metacestóide pelo cachorro vinagre; e- escólex desenvaginado; f- verme adulto; g- ingestão de ovo por humanos; h- metacestóides. Fonte: Ilustração de Bruno Eschenazi – Laboratório de Produção e Tratamento de Imagem – IOC – Fiocruz.



Figura 2 - *Speothos venaticus*, hospedeiro definitivo natural de *Echinococcus vogeli*. Fonte: Laboratório de Referência Nacional em Hidatidose – IOC / Fiocruz.

Duas das maiores presas do cachorro-do-mato-vinagre são roedores originários da América do Sul, com grande distribuição geográfica em regiões tropicais, abrangendo desde o sudeste mexicano até o nordeste argentino. São eles a paca (*Cuniculus paca*) (Figura 3) e a cutia (*Dasyprocta sp.*), considerados os hospedeiros naturais do *E. vogeli* (Eisenberg & Redford, 1989).



Figura 3 - *Cuniculus paca*, hospedeiro intermediário do *Echinococcus vogeli*. Fonte: Laboratório de Referência Nacional em Hidatidose – IOC / Fiocruz.

Existe um elevado grau de especificidade do parasito em relação a seus hospedeiros intermediários. A infecção dos roedores começa quando estes ingerem proglotes grávidas ou ovos eliminados nas fezes pelos canídeos (Rausch & D'Alessandro, 1999; Brehn & Koziol, 2017). As camadas externas dos ovos são digeridas no duodeno do hospedeiro, quando liberam os embriões ou oncosferas, que atravessam a parede intestinal, chegam à circulação porta e alojam-se no fígado, desenvolvendo o estágio larvar ou metacestódeo (Moraes & Arnaud, 1997; D'Alessandro & Rausch, 2008).

A infecção humana ocorre acidentalmente, quando os ovos expelidos pelos cães ficam dispersos no ambiente, podendo contaminar a água e os alimentos. O contato direto com as fezes dos cães também exerce um papel importante na infecção. Nos humanos, o parasito não consegue se desenvolver até a forma adulta, mas o metacestódeo pode se desenvolver, geralmente no fígado, causando diversos transtornos e podendo ser até mesmo letal (Acha & Szyfres, 1989; Meneghelli et al., 1990; Meneghelli et al., 1992).

A quantidade substancial de casos humanos de EP (D'Alessandro e Rausch, 2008) é atribuída ao envolvimento de cães domésticos no ciclo de vida. Em boa parte de sua distribuição geográfica, as pacas são tradicionalmente caçadas por pessoas para consumo de sua carne, e suas vísceras são geralmente fornecidas aos cães, representando o principal fator da introdução de *E.vogeli* no ciclo urbano (Mayor et al., 2015). Os cães infectados eliminam ovos infectantes do parasito no solo, sendo a principal fonte de infecção para os humanos. Os ovos expelidos pelo cão selvagem no ambiente natural têm pouca importância para a saúde pública (Soares et al., 2004, Paramasvaran et al., 2009).

1.3.2. Morfologia de *E. vogeli*

E. vogeli, assim como outros cestóides, apresenta, na sua forma adulta, corpo segmentado, dividido em escólex (figura 4), onde estão presentes ventosas com um rostro armado com duas fileiras de ganchos ou rostelos, colo e estróbilo (Eckert & Deplazes, 2004). A morfologia dos adultos de *E. vogeli* difere em alguns aspectos das outras espécies do mesmo gênero, como no tamanho do estróbilo,

na posição da proglote madura e dos segmentos grávidos, na forma do útero grávido e no tamanho dos ganchos rostelares (Rausch & Bernstein, 1972). O estróbilo do verme adulto mede de 3,9 a 5,6 mm e se origina a partir do colo, onde há intensa proliferação celular, sendo que as proglotes grávidas que constituem o estróbilo são longas e cilíndricas, representando quase a metade do tamanho da estrutura, o que faz com que seja o maior estróbilo entre as espécies do gênero (D'Alessandro & Rausch, 2008).

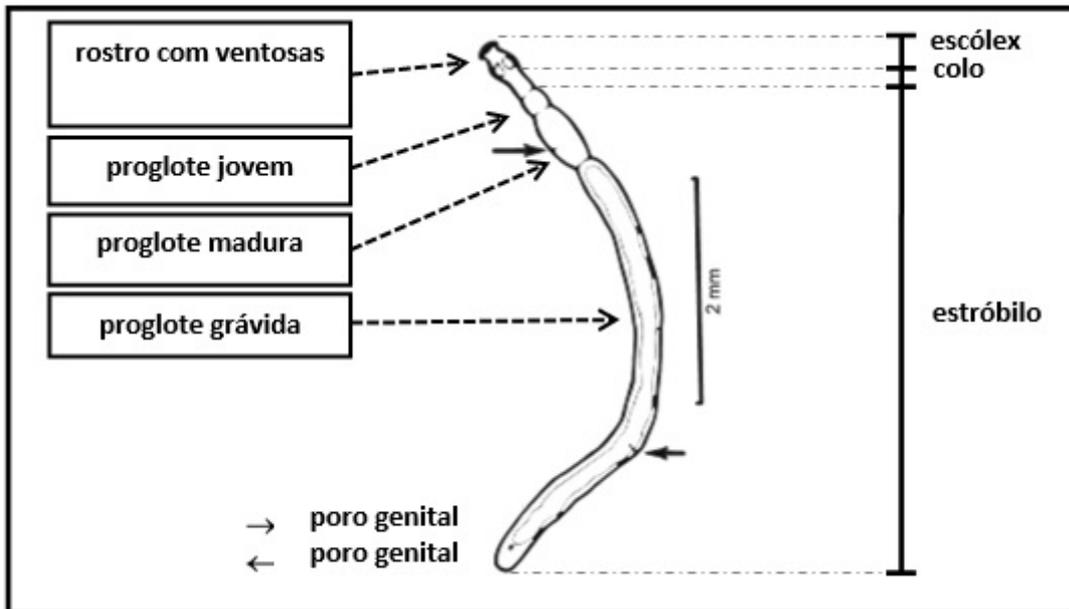


Figura 4 – Esquema do verme adulto de *E. vogeli*. Fonte: Laboratório de Referência Nacional em Hidatidose -IOC/Fiocruz.

As proglotes são classificadas quanto à sua maturação (Eckert & Deplazes, 2004), podendo ser imaturas, maduras ou grávidas. As que atingem a maturidade apresentam aparelho reprodutor tanto masculino quanto feminino, enquanto as proglotes grávidas são repletas de ovos e apresentam determinado grau de atrofia dos aparelhos reprodutores.

A formação do cisto hidático acontece depois da ingestão dos ovos pelos hospedeiros intermediários ou acidentais, onde a oncosfera dá início à diferenciação. Após serem ingeridos, os ovos sofrem ação de enzimas digestivas, passam por um processo de dois estágios, sendo eles: a desagregação passiva do embrióforo e a ativação e liberação das oncosferas. Após a liberação, as oncosferas atravessam a mucosa intestinal e alcançam a circulação porta-

hepática, podendo atingir o fígado ou outros órgãos, dando origem então ao cisto hidático (Lewall & McCorkel, 1986; Eckert & Thompson, 2017).

O cisto hidático (figura 5) é composto externamente por uma membrana adventícia, resultado da reação tecidual do órgão parasitado e do sistema imunológico à presença da larva, contendo muitas células inflamatórias e com variada espessura de acordo com o sítio de infecção. Além da membrana adventícia, duas outras membranas são observadas: a membrana anista, composta por escleroproteínas, com papel importante na estrutura e transporte de substâncias, sendo eosinofílica, amorfa e geralmente avascular, e a membrana germinativa, de natureza celular, em cuja parede interna brotam vesículas prolíferas com protoescólices, sendo responsável pela secreção do líquido hidático (Thompson, 2017).

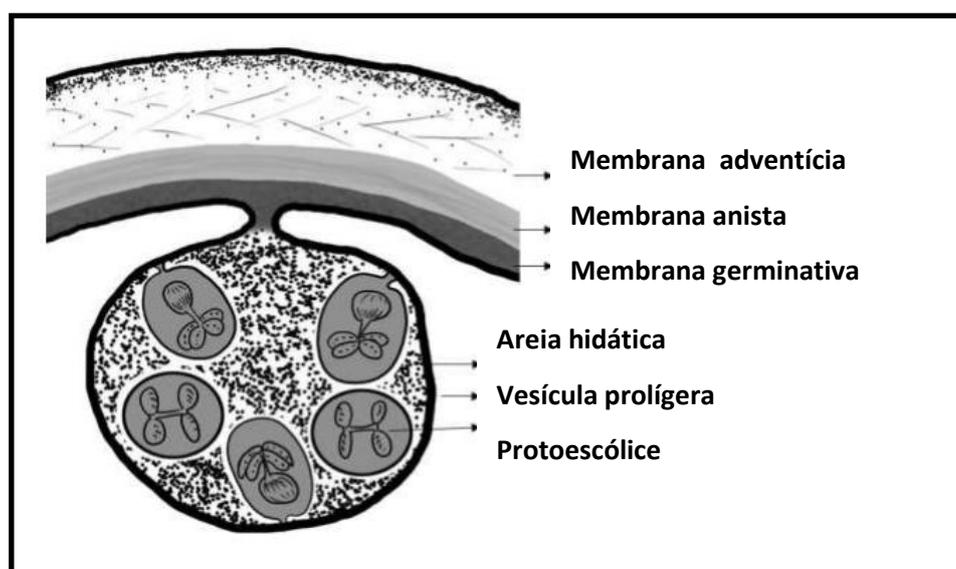


Figura 5 – Cisto hidático. Fonte: Ilustração de Bruno Eschenazi - Serviço de Produção e Tratamento de Imagem – IOC – Fiocruz.

Os mecanismos pelos quais os fluidos e as substâncias são transferidos para dentro do cisto ainda não são bem conhecidos, porém, sabe-se que grande parte das proteínas e lipídios encontrados no líquido hidático não são sintetizados pelo parasito, sendo provenientes do hospedeiro, o que demonstra haver utilização “positiva” pelo parasito das substâncias secretadas pelo

hospedeiro, possivelmente para a defesa contra o mesmo (Shapiro et al., 1992; Brehm & Koziol, 2017). Sendo assim, é importante salientar que as membranas não funcionam como uma barreira para macromoléculas *in vivo*, como já foi claramente demonstrado pela penetração de proteínas hospedeiras marcadas (incluindo imunoglobulinas) nas camadas de metacestóides de *E. granulosus in vitro* (Brehm & Koziol, 2017).

Dentro do cisto, as vesículas prolíferas podem estar aderidas à parede através de um pedículo ou ficam soltas no líquido hidático, formando a chamada areia hidática. É comum observar tanto vesículas íntegras como protoescólices livres na composição da areia hidática (Marty & Andersen, 1995). Os protoescólices são um dos estágios larvais de desenvolvimento dos ciclofilídeos e caracterizam-se por medirem até 203 (μm), possuindo órgãos adesivos (ventosas e ganchos rostelares) invaginados. Estes vão constituir a extremidade anterior do parasito adulto no intestino do hospedeiro definitivo (Bourée, 2001; D'Alessandro & Rausch, 2008).

Os ganchos rostelares, geralmente encontrados livres no interior do cisto, são estruturas formadas por um cabo, uma guarda e uma lâmina, possuindo uma polpa central amorfa. Os ganchos podem variar em número, tamanho e forma (Almeida et al., 2007).

O protoescólex é a forma infectante para o hospedeiro definitivo. Nele são encontrados dois tipos de ganchos, um superior, que é maior e possui guarda arredondada e robusta e um inferior, que é menor e possui guarda achatada (Hobbs et al., 1990; Antoniou & Tselentis, 1993). As diferenças morfológicas equivalem às diferentes funções que os ganchos exercem. Enquanto os grandes ganchos possuem movimentos livres responsáveis pela locomoção, os pequenos ganchos são responsáveis pela fixação dos helmintos (Antoniou & Tselentis, 1993).

1.3.3. Epidemiologia

A EP é endêmica na região Neotropical das Américas, que inclui a Região Norte do Brasil, e tem um impacto significativo em termos de morbidade e mortalidade para as populações humanas afetadas (Romig et al., 2017).

O número total de casos humanos de EP relatados (242 até 2016) é provavelmente apenas uma pequena fração das infecções atuais, uma vez que vários países onde a doença ocorre não têm notificação compulsória. Além disso, a dificuldade de diagnóstico laboratorial, a dificuldade de acesso a vários locais endêmicos, a desinformação e a inespecificidade dos sintomas colaboram negativamente para que a real ocorrência da doença seja conhecida. Soma-se também o fato de que a doença apresenta sintomatologia tardia, fato que faz com que a doença só seja descoberta em estágios avançados (Novo Alonso et al., 1993; D'Alessandro & Rausch, 2008, Kern et al., 2017).

Atualmente, o Brasil representa o país com mais casos de EP, com a maioria dos casos relatados sendo provenientes da região amazônica (Siqueira et al., 2003; Kern et al., 2017), principalmente nos estados do Acre, onde a doença é vulgarmente conhecida como doença da paca (Meneghelli et al., 1986; D'Alessandro et al., 1996; Meneghelli et al., 1998; Siqueira et al., 2010) e Pará (Soares et al., 1999; Soares et al., 2004). Já foram encontrados casos isolados em outras regiões ou estados como Rondônia (Rodrigues-Silva et al., 2002), nas regiões sudeste (Chapadeiro et al., 1964; Ferreira et al., 1987, 1995); centro-oeste (Timmerman et al., 1986) e nordeste (Machado et al., 1964). Dois estudos de soroprevalência demonstraram uma alta frequência (13,2%) da EP em população estudada em Sena Madureira, no estado do Acre, o que reforça a hipótese de que muitos casos não estejam sendo notificados na região e a ocorrência da doença seja muito maior (Pastore, 2001; Pastore et al., 2003).

A EP é tipicamente diagnosticada em indivíduos entre 40 e 60 anos de idade, o que pode refletir um longo período de latência, porém manifestações clínicas agudas também podem ocorrer. Lesões extensas são raras em pacientes com menos de 22 anos de idade e a doença é identificada em homens 1,5 vezes mais frequentemente do que nas mulheres (Kern et al., 2017).

1.3.4. Aspectos clínicos

As características clínicas da EP em seres humanos variam de acordo com a localização do cisto hidático e com a extensão da invasão aos tecidos. As larvas de *Echinococcus* spp. normalmente se alocam no fígado (figura 6), sendo que 81% dos casos já analisados clinicamente demonstram que o fígado sozinho ou com vesículas situadas no abdômen, fígado e pulmões/cavidades pleurais ou vesículas calcificadas no próprio fígado foram os sítios de infecção encontrados (D'Alessandro & Rausch, 2008). As razões para tal não são completamente compreendidas, mas parece ser uma consequência de retenção mecânica das oncosferas em redes de capilares ou vasos linfáticos de menor calibre. (Brehm & Koziol, 2017).

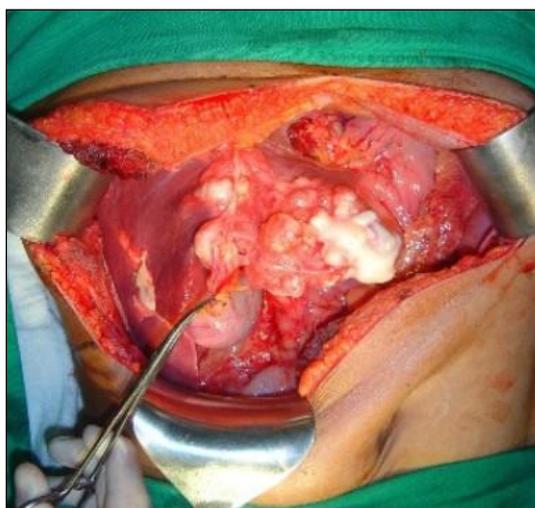


Figura 6 - Visão geral de um fígado humano infectado por *Echinococcus vogeli* Fonte: Laboratório de Referência Nacional em Hidatidose – IOC/ Fiocruz.

Apesar de ser de pouco impacto para a economia mundial, a EP causa imensos prejuízos locais, tanto no que diz respeito à economia das regiões afetadas quanto aos impactos sociais (Siqueira, 2010). As manifestações clínicas decorrentes da EP constituem um importante problema de saúde pública no norte do país, principalmente em regiões com carência de educação sanitária e políticas de saúde adequadas (D'Alessandro, 1997). Dentre os impactos com maior recorrência relacionados à mortalidade e morbidade em seres humanos, destaca-se a proliferação endógena e exógena de vesículas na superfície e no interior do fígado (Rausch & D'Alessandro, 1999), terminando por envolver outros órgãos

abdominais ou torácicos , como mesentério, omento, ductos biliares, tecido celular subcutâneo da parede abdominal, pericárdio, pulmões, pleura, veia cava inferior e átrio direito (Siqueira et al., 2007).

O cisto hidático cresce cerca de 1 a 5 cm por ano (Zhang et al., 2012) e é a partir da membrana germinativa que se desenvolvem as cápsulas prolíferas onde brotam desde poucos até numerosos protoescólices. Nas vesículas prolíferas podemos encontrar os protoescólices apresentando diversos estágios evolutivos ou até mesmo degenerados, causando necrose (Almeida, 2012).

1.3.5. Imunobiologia da infecção

A interação entre o hospedeiro intermediário e o parasito em termos imunobiológicos é mais bem caracterizada para *E. granulosus*. Sabe-se há décadas que os hospedeiros intermediários de *E. granulosus* apresentam respostas imunológicas tanto humorais quanto celulares ao parasito, o que confere grande resistência à reinfecção. Grande parte dos cistos hidáticos, tanto nas infecções por *E. granulosus* quanto por *E. vogeli*, não apresenta viabilidade longa e morrem em algum momento após o estabelecimento no hospedeiro intermediário, formando nódulos calcificados. É bem provável que este processo ocorra em função da ação do sistema imunológico do hospedeiro (Rogan & Craig, 1997, Riganò et al., 1998).

Estima-se que as estruturas responsáveis pela ativação do sistema imune sejam as oncosferas presentes nos cistos hidáticos, mais especificamente na areia hidática. Essa resposta envolve elevados níveis de anticorpos de classe IgG, IgM e IgE (Dixon & Jenkins, 1995; Siles-Lucas et al., 2017) e a condição do cisto é preponderante para a maior ou menor estimulação antigênica. Em uma minoria de casos pode existir uma limitação de sensibilidade visto que a ocorrência de resposta específica está aparentemente relacionada à essa condição dos cistos hidáticos, sendo que cistos intactos praticamente não apresentam níveis significativos de estimulação antigênica. No entanto, a regra é a de que a maioria dos indivíduos infectados produz níveis detectáveis de anticorpos específicos contra antígenos larvais, como o Antígeno B (AgB) (Schantz, 1989; Siles-Lucas et al., 2017; Wen et al., 2019).

A produção de anticorpos nos seres humanos varia de acordo com o tipo de antígeno secretado pelo parasito. As IgGs 1, 2 e 3 estão associadas ao processo de destruição do cisto, enquanto a IgG4 está associada ao desenvolvimento e progressão do cisto (Daeki et al., 2000).

Ambos os mecanismos efetores mediados pelas células T CD4+ (Th1 e Th2) estão presentes na resposta ao parasito, sendo regulados por diferentes grupos de citocinas. Assim como observado em outras parasitoses, a equinococose estimula reações de hipersensibilidade imediata, elevando os níveis de IgE e de eosinófilos e ativação de mastócitos (Riganò et al., 1997; Siles-Lucas et al., 2017).

Já foram verificados alguns mecanismos de evasão produzidos pelo metacestódeo de *E. granulosus*. Thompson & Lymbery (1995) observaram que substâncias são secretadas pelo parasito, atuando de maneira a interferir diretamente nos mecanismos da resposta imune efetora. Outros mecanismos já observados envolvem a supressão da transformação blástica das células T pelo líquido hidático, produção de fatores imunomodulatórios, modificação na produção de citocinas, interferência na atividade do sistema complemento e ativação policlonal inespecífica de linfócitos (Wattal, 1990; Wakelin, 1997; Zhang et al., 2003).

1.3.6. Diagnóstico

A EP pode apresentar ausência de sintomas durante seu desenvolvimento e quando os apresenta, a sintomatologia não é específica, fazendo com que represente um desafio diagnóstico para os pesquisadores e médicos. Nesse contexto, os dados epidemiológicos são essenciais para que possam ser levantadas suspeitas e os casos sejam melhor investigados. Dados como procedência dos pacientes, hábitos comportamentais como contato com cães alimentados por vísceras de roedores e exame físico apresentando presença de massas palpáveis no hipocôndrio direito são essenciais para a busca de um diagnóstico conclusivo (Zhang & Mcmanus, 2006).

O prognóstico das equinococoses depende de múltiplos fatores (quantidade e localização dos cistos, estágio, etc), o que torna o manejo da doença bastante complexo. Por consequência, o diagnóstico e o acompanhamento dos pacientes ainda é um motivo de grande preocupação devido a várias dificuldades relacionadas com os métodos adjuntos utilizados para apoiar os resultados de técnicas de imagem. Atualmente, com métodos diagnósticos modernos, a identificação do parasito tem sido mais fácil em casos de EP. No entanto, praticamente todos os métodos disponíveis ainda apresentam resultados inconclusivos quanto à especificidade do agente etiológico. Para que se possa definir um diagnóstico preciso é necessário a utilização de métodos moleculares em busca da identificação do DNA ou exame parasitológico em espécimes de tecido humano e animal, contendo a forma larvar, tendo em vista que esta difere-se nos diferentes gêneros, sendo a espécie definida pelo tamanho dos ganchos rostelares (Rausch & D'Alessandro, 1999; Siles-Lucas et al., 2017; Thompson, 2017).

1.3.6.1. Achados laboratoriais

Testes laboratoriais não podem ser usados para fazer um diagnóstico conclusivo da doença, mas são importantes na avaliação de danos à árvore biliar. Quando acontece infiltração do sistema biliar, é possível identificar danos ao fígado. Os achados laboratoriais geralmente apresentam aumento de fosfatase alcalina, bilirrubina, transaminases hepáticas, gamaglobulinas e eosinófilos, além de diminuição dos níveis de albumina e hemoglobina. Porém, essas características são comuns a outras enfermidades e com apenas essas informações não é possível realizar um diagnóstico conclusivo (D'Alessandro & Rausch, 2008).

1.3.6.2. Diagnóstico por imagem

Uma das alternativas que tem trazido importantes contribuições para o diagnóstico da EP são os achados radiológicos. Os exames de raio-x podem mostrar massas do parasito e calcificações sugestivas, que geralmente são arredondadas, medindo de 2 a 3 cm de diâmetro com um alo radiodenso e um centro limpo. Esses achados podem ser vistos no fígado ou em qualquer outro órgão que seja acometido pela doença (D'Alessandro, 1997). Na ultrassonografia

podem ser observadas formações múltiplas, uniloculares e com paredes irregulares (D'Alessandro & Rausch, 2008).

Já a tomografia computadorizada atualmente é o melhor procedimento dos métodos por imagem, não somente para a equinococose, mas para todas as lesões policísticas, no entanto, é também o mais caro (D'Alessandro et al., 1996; Kern et al., 2017). O método pode evidenciar cistos superficiais menores, indetectáveis nos outros exames, além de permitir a localização exata dos cistos, a avaliação da extensão das lesões hepáticas, a demonstração de calcificações no fígado e o acometimento do mesentério e de outros órgãos abdominais (Fonseca-Jr & Costa, 1995; Siqueira, 2010). Esta técnica também é utilizada na avaliação do controle de cura após a intervenção cirúrgica (D'Alessandro & Rausch, 2008). Para o diagnóstico de equinococose cística e alveolar, outros exames têm sido utilizados, como a ressonância magnética nuclear e a ressonância magnética angiotrófica (Mubanga et al., 2019).

1.3.6.3. Testes sorológicos em seres humanos

Os testes sorológicos são uma ferramenta bastante útil e apresentam grande importância como metodologia de apoio para o diagnóstico das equinococoses, inclusive para infecções que ainda não desenvolveram manifestações clínicas. Atualmente, existem diversos testes sorológicos que buscam anticorpos contra os antígenos do parasito, porém nenhum deles apresenta especificidade para *Echinococcus vogeli*, se constituindo como testes gênero-específicos (D'Alessandro & Rausch, 2008; Thompson, 2017; Mubanga et al., 2019).

As primeiras técnicas utilizadas para identificar componentes antigênicos da fase larvar de *E. granulosus* foram a dupla difusão em ágar e a imunoeletroforese, onde foram utilizados soros de animais imunizados e de hospedeiros infectados (Rickard & Lightowers, 1986). Os testes sorológicos para diagnóstico das equinococoses incluem ainda hemaglutinação indireta, imunoeletroforese, contra-imunoeletroforese, dupla difusão em gel, imunofluorescência indireta, imunoenensaio enzimático (ELISA) e imunoblot (Babba et al., 1994). No entanto, reações cruzadas com outros helmintos, principalmente

cestóides, neoplasias e doenças imunológicas crônicas são bastante comuns em diversos desses testes (Leggat et al., 1992; Gottstein et al., 1995; Li et al., 2004; Carmena et al., 2005).

Wilson et al. (2006) publicaram um estudo de análise de métodos de diagnóstico moleculares e imunológicos de doenças parasitárias, baseados em sua experiência no Centro de controle e prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos. Os autores constataram que reações falso-positivas podem ocorrer em pessoas com outras infecções helmínticas, câncer e desordens imunes crônicas. Além disso, no caso da equinococose, testes negativos não excluem a possibilidade da doença porque algumas infecções não apresentam anticorpos detectáveis (D'Alessandro & Rausch, 2008; Wen et al., 2019).

A condição para que se tenha antígenos detectáveis depende do órgão da infecção, da integridade estrutural e da vitalidade do metacestódeo (Schantz, 1989; Wen et al., 2019). Aparentemente, os cistos presentes no fígado provocam melhores respostas antigênicas do que os presentes no pulmão ou outras localidades.

Pacientes com cistos calcificados ou mortos geralmente apresentam sorologia negativa (D'Alessandro & Rausch, 2008; Wen et al., 2019). Por todos esses fatores supracitados, o melhor diagnóstico conclusivo em testes sorológicos é conseguido por uma combinação de testes. O ELISA e a hemaglutinação indireta são utilizados para diagnosticar as espécies do gênero. Um resultado positivo por uma dessas técnicas pode ser confirmado por um imunoblot, demonstrando a presença de proteínas antigênicas. É sabido que esses testes podem ter resultados com porcentagem alta de falso-positivos em reações cruzadas com a neurocisticercose, porém as características clínicas e epidemiológicas das duas doenças são muito diferentes.

As preparações antigênicas mais utilizadas para os testes sorológicos das infecções por *E. vogeli* são os extratos proteicos de metacestóides de *E. granulosus*. Em adição, alguns antígenos purificados de espécies do gênero *Echinococcus* foram desenvolvidas e podem ser utilizados (Gottstein et al., 1995). Através do uso de diversas outras técnicas, entre elas a eletroforese em

gel de poliacrilamida-SDS em associação ao imunoblot e a produção de anticorpos monoclonais, foram definidos 2 antígenos considerados específicos, por apresentarem dominância nas preparações de líquido hidático, sendo designados pela maioria dos autores como antígeno 5 (Ag5) (Capron et al., 1967) e AgB (Oriol et al., 1971). Estes antígenos representam atualmente as proteínas mais bem estudadas para o gênero (Ferreira & Zaha 1994; Brehm & Koziol, 2017)

A utilização de um antígeno mais sensível e específico que possa ser mais facilmente detectado e principalmente produzido, é essencial para melhorias no diagnóstico através testes sorológicos. A busca por antígenos recombinantes que permitam obtenção de grande quantidade de material antigênico já demonstrou ser um caminho viável para o diagnóstico sorológico, pois além de dispensar o uso de animais para obtenção de antígeno, apresentam menor variação quando comparados com antígenos brutos ou purificados (Greene et al., 2000; Obregon-Henao et al., 2001; Silva et al., 2002; Savardashtaki et al., 2017).

Baseado nessas informações, a utilização de somente um teste sorológico como ferramenta diagnóstica ainda pode apresentar resultados indefinidos. A melhor forma de se obter resultados confiáveis é a utilização de um teste sorológico mais sensível, como o ELISA, acompanhado de outro teste sorológico de alta especificidade, como o imunoblot (D'Alessandro & Rausch, 2008; Siles-Lucas et al., 2017). Comparando o resultado dos testes sorológicos com os testes por imagens e dados epidemiológicos e clínicos é possível chegar a um diagnóstico mais confiável da doença, porém, como já dito anteriormente, um diagnóstico definitivo preciso só pode ser dado através da análise morfológica dos metacestóides ou pela análise molecular das amostras.

1.3.6.4. Antígenos utilizados no imunodiagnóstico de equinococoses

Tradicionalmente, os antígenos utilizados nos testes sorológicos para o diagnóstico da EP constituem-se basicamente de antígenos brutos presentes no líquido hidático de *E. granulosus* (Gottstein et al., 1995). O uso de antígenos brutos é de grande valia para o desenvolvimento das técnicas imunológicas utilizadas até

hoje no diagnóstico de parasitoses. Um estudo feito com amostras provenientes de vários países asiáticos demonstra que a utilização de antígenos brutos representa uma razoável ferramenta diagnóstica para detecção de casos de EC causada por *E. granulosus*, demonstrando grande sensibilidade (Sadjjadi et al., 2007; Mohammadzadeh et al., 2012). No entanto, existem diversas dificuldades na obtenção do material, como a necessidade de coleta diretamente do animal infectado, que no caso de *E. vogeli* representa um esforço grande de trabalho de campo em locais isolados. Entretanto, existe falta de homogeneidade e quantidade, além de possível contaminação com proteínas do hospedeiro no momento da retirada dos metacestóides e presença de antígenos do parasito relacionados com antígenos de outros helmintos. Em resumo, sua obtenção é considerada trabalhosa e de baixo rendimento (Restrepo et al., 2000; Espíndola, 2004).

O teste de imunoblot atualmente é o mais utilizado para o diagnóstico gênero-específico da doença, podendo apresentar sensibilidade de 90% e especificidade que pode chegar a 100% (Maddison et al., 1989; Siles-Lucas et al., 2017). Rodrigues–Silva et al. (2011) demonstram como critério de positividade a presença de 1 a 4 bandas com massas relativas expressas em quilodaltons (kDa).

O ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA) vem demonstrando ser também um teste bastante eficiente em virtude de sua elevada sensibilidade, assim como pela necessidade de baixas quantidades de antígeno. Diversos autores demonstram sucesso utilizando esta técnica com preparações antigênicas brutas (Farag et al., 1975; Pinel et al., 1989; Gottstein et al., 1995), antígenos purificados (Rickard, 1984; Njeruh et al., 1986) ou antígenos recombinantes (Lightowlers, 1990; Ferreira & Zaha, 1994, Virgínio et al., 2003; Faramarzi et al., 2019; Wang et al., 2019).

Os antígenos purificados de espécies do gênero *Echinococcus* geralmente utilizados são os antígenos Ev2 e Arc 5, porém não são capazes de apresentar resultados espécie-específicos para *E. vogeli*. Além disso, este teste demonstra ter baixa praticidade, visto que o processo de rendimento da purificação é muito baixo, tornando a obtenção desses antígenos cara e demorada (Ferreira et al., 1996).

Antígenos heterólogos têm sido utilizados com sucesso no diagnóstico de infecções por outros cestóides, como a cisticercose e a EC. Estudos demonstraram que frações antigênicas presentes em diferentes espécies do gênero *Taenia* possuem homologia parcial, o que abriu a possibilidade do uso desses antígenos para diagnóstico laboratorial da neurocisticercose (Zarlenga et al., 1994; Chung et al., 1999; Peralta et al., 2002). Em adição, outro estudo que demonstra ser bastante útil para os testes sorológicos é a utilização de fluidos de cisto hidático obtidos de ratos experimentalmente infectados com *E. granulosus* (Mamuti et al., 2002). O desenvolvimento do metacestódeo em peritônio de camundongos poderia vir a ser um importante modelo laboratorial para a identificação e produção de antígenos heterólogos para o diagnóstico da EP, porém apresentam muitas dificuldades, como a necessidade do uso de animais e a heterogeneidade dos fluidos hidáticos coletados, além de serem considerados de baixo rendimento e com processo mais trabalhoso (Larralde et al., 1989; Vaz et al., 1996, Siles-Lucas et al., 2017).

Uma estratégia alternativa para a produção em grande escala de antígenos puros é a utilização de métodos de DNA recombinante. Estes métodos permitem a clonagem das sequências codificadoras de antígenos de interesse e a produção de proteínas recombinantes em grande escala. Uma ampla gama de sistemas de expressão é atualmente utilizada, incluindo bactérias, leveduras, fungos, algas, células de insetos e de mamíferos (Rosano & Ceccarelli, 2014; Gifre et al., 2017). Como exemplo, diversas linhagens da bactéria *Escherichia coli* podem atuar como hospedeiras de plasmídeos que contenham a sequência gênica que codifica a proteína de interesse (Gifre et al., 2017), podendo produzir modificações que resultam em produtos com características diversas. Além disso, vetores diferentes podem proporcionar a expressão em fusão com diferentes *tags*, como caudas de histigina ou glutatona-S-transferase, o que facilita a purificação dos produtos recombinantes (Siles-Lucas et al., 2017).

Diversos estudos na literatura descreveram a utilização de antígenos recombinantes para o diagnóstico de parasitos, inclusive de espécies do gênero *Echinococcus* (Savardashtaki et al., 2019; Wang et al., 2019). Diversas sequências codificadoras de antígenos foram clonadas, transformadas e expressas para o *E.*

granulosus, assim como várias subunidades do AgB, Em18, entre outros. (Rott et al., 2000; Sako et al., 2000; Virgínio et al., 2003; Mamuti et al., 2004; Mamuti et al., 2006; Li et al., 2010; Bashiri et al., 2019).

A necessidade de um diagnóstico preciso e padronizado para a EP é mais que evidente. São diversos os esforços de pesquisadores ao redor do mundo utilizando antígenos recombinantes para padronização de métodos diagnósticos para as equinococoses causadas por outras espécies do gênero, porém pouco sabemos sobre o potencial desses antígenos para o diagnóstico da EP (Siles-Lucas et al., 2017; Faramarzi et al., 2019; Savardashtaki et al., 2019; Wang et al., 2019).

1.3.6.5. Diagnóstico molecular

Com o advento das abordagens moleculares e bioquímicas para a detecção de parasitos, diferentes métodos foram desenvolvidos durante os últimos 30 anos, a fim de identificar variantes genéticas de *Echinococcus* spp. tanto em hospedeiros animais como em seres humanos. Tais estudos, principalmente com a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados para a identificação de espécies, genótipos e haplótipos (microvariantes) observados dentro de *E. granulosus* s.s., para diagnóstico diferencial de *E. granulosus* sensu lato (s.l.) e em *E. multilocularis*. Metodologias baseadas em PCR encontraram uma ampla aplicabilidade para detecção do parasito e definição da espécie, além de estudos populacionais e investigações epidemiológicas do gênero, principalmente devido a sua alta sensibilidade analítica que permite a análise das regiões dos genes nucleares e mitocondriais a partir de amostras frescas, congeladas, fixadas em etanol e até com material do parasito fixado em parafina. No entanto, devido à necessidade de amostras de tecido humano ou animal parasitado, também se apresenta como método auxiliar de definição diagnóstica (Lymbery, 2017; Siles-Lucas et al., 2017).

1.4. Tratamento e prevenção de equinococoses

Com base na classificação de acordo com os exames de imagem e seguindo uma abordagem específica do estágio, algumas opções de tratamento das equinococoses são possíveis: (1) cirurgia; (2) intervenções não cirúrgicas; (3) tratamento medicamentoso anti-infeccioso com benzimidazol e; (4) uma abordagem de "observar e esperar". Segundo Wen et al. (2019), as recomendações atuais para a gestão do tratamento para a equinococose tomam o tratamento do câncer como base, considerando-se que é uma doença com propensão ao retorno, necessitando de uma abordagem multidisciplinar, com consultas de equipe interdisciplinar para as decisões terapêuticas, combinação de tratamentos cirúrgicos e medicamentosos, acompanhamento a longo prazo dos pacientes, estabelecimento de recomendações internacionais e a criação de centros de referência.

Como não existem estudos prospectivos avaliando o tratamento de pacientes com EP, a gestão de casos deve basear-se nos benefícios e riscos percebidos de cada modalidade de tratamento (D'Alessandro e Rausch, 2008; Siqueira et al., 2013). Essa abordagem adotada tem como referência a experiência terapêutica para *E. granulosus* (Kern et al., 2017). O tratamento cirúrgico é a conduta comumente adotada para a maioria dos casos, e geralmente resulta em melhora clínica ou cura dos pacientes (Siqueira et al., 2013). Nos casos de disseminação hepática com envolvimento da vesícula biliar e do sistema porta, o transplante hepático pode ser uma opção favorável para o tratamento da equinococose hepática avançada (Genzini et al., 2013).

A disseminação extensa dos cistos em alguns casos limita as possibilidades de cirurgia para ressecção dos cistos de *E. vogeli*. Além disso, muitas vezes o paciente é levado ao processo cirúrgico sem um diagnóstico preciso, principalmente com hipótese diagnóstica de doença neoplásica, levando à falta de planejamento adequado para a não ressecção de lesões extensas. Esta situação pode ocorrer até mesmo piorando o quadro do paciente, podendo surgir novas lesões pela contaminação da cavidade por ruptura dos cistos sem proteção, que pode ser realizada através da administração de agentes esclerocidas, como a solução hipertônica de cloreto de sódio a 15% (Brunetti et al., 2010).

A administração de benzimidazólicos é o tratamento clínico mais utilizado, com destaque para o mebendazol e o albendazol em tratamentos de longo prazo, no entanto, segundo Hemphill et al. (2007), estes medicamentos parecem apenas estabilizar os sintomas nos casos estudados de equinococose alveolar. Ainda não existem estudos que permitam determinar os efeitos de tais medicamentos na equinococose neotropical causada por *E. vogeli*, até porque o número de pacientes estudados ainda é pequeno (Siqueira et al., 2002; D'Alessandro & Rausch, 2008). Apesar disso, parece ser consensual o uso de albendazol na dose de 10 mg/kg/dia a longo prazo, principalmente pelo fato de o mebendazol ser pouco absorvido (Tracy & Webster, 2005).

Uma técnica chamada *puncture, aspiration, injection, re-aspiration* (PAIR) tem sido amplamente utilizada em áreas de alta endemicidade de equinococose por *E. granulosus*, locais estes onde a demanda supera os recursos locais para tratamento cirúrgico (Ustünsöz et al., 1999; Bruneti et al., 2010). É possível que este método seja útil como opção terapêutica para casos de EP contendo cistos de grande volume ou nos casos onde a ressecção não se apresenta como uma possibilidade (Siqueira, 2010).

No que tange à prevenção da doença, vários estudos evidenciaram o desenvolvimento de respostas imunes protetoras em hospedeiros intermediários de *E. granulosus* (Wen et al., 2019; Larrieu et al., 2019). Essa característica indica a viabilidade de estudos sobre possíveis vacinas contra a infecção pelo metacéstódeo do parasito. Tanto os protoescolíces quanto as oncosferas contêm antígenos de interesse para a vacinação e para a imunoterapia, porém a necessidade de obtenção destes em grande escala torna difícil sua utilização (Stutzer et al., 2018; Sreevatsava et al., 2019). Para resolver tal problema, a utilização de proteínas recombinantes tem demonstrado grande potencial. A proteína recombinante EG95 e outras variantes foram testadas com sucesso como vacina recombinante contra *E. granulosus*, mostrando uma proteção eficaz (Gruber et al., 2017; Jazouli et al., 2017).

Sreevatsava et al., (2019) abordaram a variabilidade genética do gene codificador da proteína EG95 em 24 isolados de *E. granulosus* provenientes de animais e humanos. Esta variabilidade é importante para o desenvolvimento de

vacinas, visto que a apresentação, o processamento e o reconhecimento dos antígenos podem apresentar grande variabilidade. Os autores demonstraram que os isolados pertenciam a somente um cluster e eram semelhantes a quatro isoformas de EG95. A análise de mapeamento de epítomos revelou que as propriedades físico-químicas dos aminoácidos presentes no epítomo linear de células B variou entre humanos e animais, bem como entre os estágios larval e adulto do parasito. No entanto, epítomos de linfócitos T citotóxicos em dados de sequência primária permaneceram constantes em todos os isolados, indicando potenciais sítios antigênicos em células T.

Em estudo de campo realizado em Rio Negro, Argentina, Larrieu et al., (2019) avaliaram o potencial da vacinação de ovinos com EG95 em acompanhamento por oito anos. Os autores observaram uma redução estatisticamente significativa na prevalência da EC nos ovinos e concluíram que a vacina pode ser usada para reduzir a transmissão de *E. granulosus*, sendo eficaz mesmo em ambientes de difícil acesso, onde somente aproximadamente metade dos ovinos nascidos nas comunidades foram vacinados.

Miles et al. (2019) identificaram potenciais antígenos e peptídeos candidatos a vacinas, partindo de uma fração enriquecida em antígenos tegumentares de protoscolex (PSEx), já conhecida por induzir proteção contra EC. Para tal utilizaram técnicas de proteômica aliadas a ferramentas de bioinformática, que permitiram a predição de 9 proteínas e 14 peptídeos como potenciais candidatos a serem testados para vacinação contra a EC. Em estudo similar, Zhao et al. (2019), apresentam 11 epítomos dominantes (5 para células B e 6 para células T) e 9 epítomos dominantes (3 para células B e 6 para células T) através de predição para as proteínas EgA31 e EgG1Y162, respectivamente. O recombinante EgA31 (rEgA31) já foi utilizado como vacina protetora e a injeção intradérmica de rEgA31 em cães foi associada a uma resposta imune celular elevada, enquanto o EgG1Y162 recombinante mostrou uma resposta imune razoavelmente forte, com alta especificidade e sensibilidade. Esses estudos demonstram que com o desenvolvimento recente nas áreas de tecnologia e bioinformática, a projeção e desenvolvimento de novas vacinas baseados em multi-epítomos de um único antígeno tornou-se uma nova abordagem para

estimular imunidade humoral e celular e melhorar a resposta do sistema imunológico.

1.5. Estratégias para prevenção e controle de equinococoses

As principais estratégias desenvolvidas para prevenção e controle das equinococoses envolvem diversas ações que, se aplicadas em conjunto, podem ser efetivas (Craig et al., 2017; Thompson, 2017). Entre essas ações podemos destacar o levantamento constante de dados epidemiológicos, informação e educação da população exposta, tratamento medicamentoso dos cães, vacinação e melhoria das condições de abate dos hospedeiros intermediários (quando viável). No caso da EP, é importante destacar o papel da alimentação dos cães com vísceras cruas de pacas na manutenção do ciclo (Bowman et al., 2004, Kachani & Heath, 2014). A população das áreas onde há frequência da doença deve ser orientada a evitar que os cães sejam alimentados com vísceras cruas, sendo recomendado o cozimento destas por 40 min ou o congelamento a -18°C durante um mínimo de 48 h.

Em geral, uma melhor compreensão dos padrões de transmissão das equinococoses é necessária, pois tem impacto em diversas questões práticas, como: (1) concepção de programas eficazes em termos de custos para controle e prevenção da doença em humanos e animais, (2) desenvolvimento de esquemas de monitoramento baseado em risco, (3) prevenção da introdução acidental de parasitos em áreas não endêmicas, (4) conservação da vida selvagem e (4) o papel dos parasitos em ecossistemas em um mundo que sofre constantes e rápidas mudanças (Romig et al., 2017).

2. Justificativa

Fazendo parte de uma linha de pesquisa do Laboratório de Helminthos Parasitos de Vertebrados (LHPV), do qual faz parte o Laboratório de Referência Nacional em Hidatidose (LRNH), que engloba estudos morfológicos, aspectos clínicos e epidemiológicos, e diagnóstico, esse estudo teve por objetivos a caracterização molecular de isolados de cistos de *E. vogeli* e produção, validação e padronização de um teste imunoenzimático utilizando dois antígenos recombinantes já padronizados para o diagnóstico da EC por pesquisadores da UFRGS (Virginio et al, 2003).

O esclarecimento das espécies ou genótipos envolvidos nas infecções pelo gênero *Echinococcus* é de suma importância para o diagnóstico da doença, desenvolvimento de vacinas, tratamento e para a implementação de programas de controle mais eficientes. *E. vogeli* é um cestódeo que apresenta ciclo de vida com hospedeiros definitivos específicos. Outras espécies do gênero demonstram grande variabilidade genética, e a genotipagem tem se mostrado essencial para o entendimento de diversos fatores envolvidos na biologia do parasito e na doença que provoca. No entanto, só existe um estudo na literatura avaliando a variabilidade genética entre amostras de *E. vogeli* (Santos et al, 2012).

Sendo assim, o aumento do conhecimento de possíveis variantes do parasito se mostra essencial para ajudar a elucidar fatores como os supracitados, aumentando a possibilidade de realizar inferências com impacto direto em desenhos de controle, medidas de prevenção e diagnóstico da doença.

Além disso, destacamos que a inespecificidade e a manifestação tardia dos sintomas dificulta o tratamento dos pacientes, levando a um agravamento da doença, a necessidade de cirurgia para retirada dos cistos e a uma real possibilidade de complicações que podem levar ao óbito (Schantz, 1989; Kern et al., 2017).

A utilização com sucesso de antígenos recombinantes pode auxiliar no acompanhamento, na identificação e no tratamento da etiologia da doença, visto que pode haver a mimetização com outras morbidades como neoplasia, entre outros. Por outro lado, não pode ser desconsiderada a sua importância para os

estudos epidemiológicos nas áreas de ocorrência da doença, com base no conhecimento do grupo de que há indivíduos que ainda não apresentam sintomatologia relevante, entretanto possuem sorologia positiva para EP. Por fim, a consecução da proposta pode representar um importante avanço na padronização de um diagnóstico sorológico que poderá ser utilizado em todo o país, além de ser disponibilizado para outros países da América Latina, com os quais estamos estabelecendo protocolos de estudo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Realizar a caracterização molecular de isolados de *E. vogeli* e padronizar e validar ensaio imunoenzimático baseado em antígenos recombinantes para o diagnóstico sorológico de equinococose policística.

3.2. Objetivos específicos

1. Obter informações sobre a estrutura e a variabilidade genética de populações de *E. vogeli* de amostras de cisto hidático do Estado do Acre.
2. Caracterizar os haplótipos das amostras de cisto hidático obtidas.
3. Contribuir para estudos taxonômicos e evolutivos do gênero *Echinococcus*.
4. Padronizar ensaio imunoenzimático baseado em antígenos recombinantes de *E. granulosus* para o imunodiagnóstico da equinococose policística.
5. Validar e verificar o desempenho do ensaio imunoenzimático padronizado para imunodiagnóstico frente a painel de soros de pacientes com equinococose policística confirmada, pacientes com outras parasitoses com potencial para reatividade cruzada, e de soros-controle negativos provenientes de indivíduos residentes em áreas endêmicas da equinococose policística.

4. Material e métodos

As etapas laboratoriais do estudo foram realizadas no Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados (Instituto Oswaldo Cruz (IOC) - Fiocruz) e no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), exceto o sequenciamento, que foi encaminhado para a plataforma de sequenciamento do IOC - Fiocruz.

4.1. Caracterização molecular de isolados de *E. vogeli*

4.1.1. Obtenção de amostras de cistos hidáticos

Os 32 cistos hidáticos utilizados neste estudo foram provenientes de excisões cirúrgicas de pacientes humanos (Anexo I) residentes em municípios do Estado do Acre (figura 7), sendo realizadas em Rio Branco, pela Fundação Hospital Estadual do Acre (FUNDHACRE). Todos os pacientes possuíam indicação cirúrgica como conduta terapêutica, devido à gravidade das lesões. Cabe esclarecer que para a realização da cirurgia, os pacientes ou seus representantes legais manifestaram a sua anuência à realização da mesma, bem como a anuência para a utilização do material obtido durante o procedimento cirúrgico para pesquisa científica. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FUNDHACRE (parecer final nº 146/2008 e encaminhado para renovação pelo Dr. Nilton Ghiotti de Siqueira) foi assinado por todos os pacientes. O material obtido por cirurgia teve como finalidades o diagnóstico e o tratamento da enfermidade do paciente. Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo foram identificados por números e são referidos somente por este número em todas as correspondências ou publicações geradas por este estudo. Todas as informações e as anotações médicas foram tratadas confidencialmente.

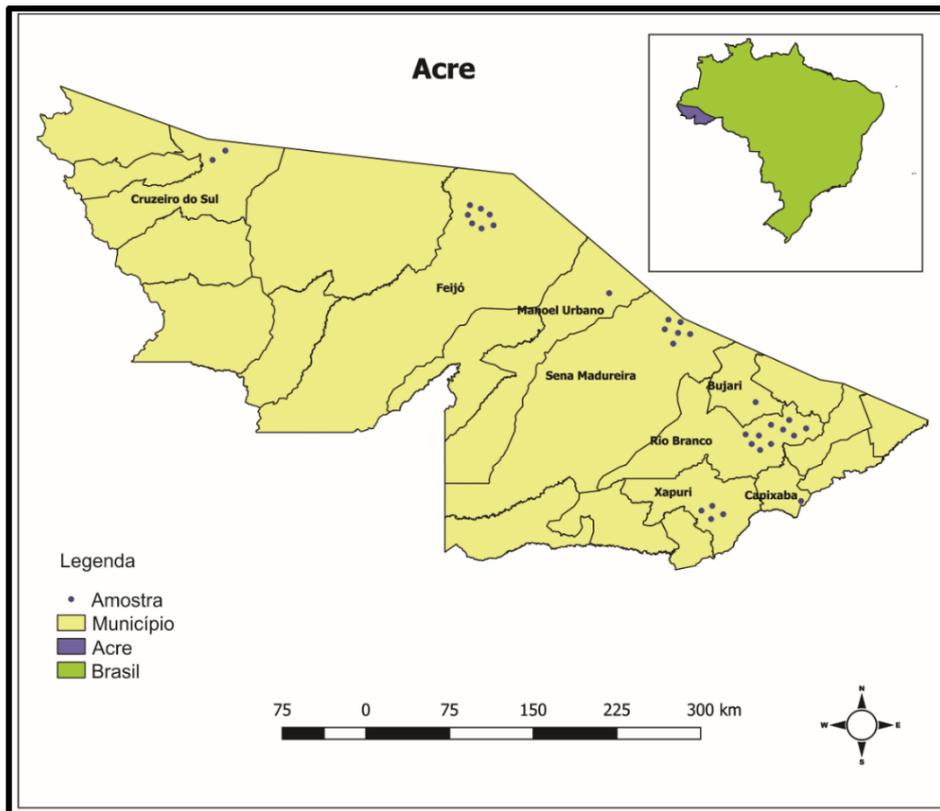


Figura 7: Mapa do Estado do Acre com a procedência dos pacientes que tiveram os cistos cirurgicamente excisados. Fonte: Laboratório de Referência Nacional em Hidatidose.

4.1.2. Processamento das amostras para extração de DNA

Os cistos excisados cirurgicamente foram provisoriamente armazenados a -20°C logo após o procedimento cirúrgico. As amostras foram então enviadas em gelo seco via transporte aéreo para o setor responsável pelo recebimento de amostras da Fiocruz, o Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS), que prontamente as encaminhou ao LRNH. O descongelamento de cada amostra de cisto hidático foi realizado somente no momento da análise molecular. O DNA total de cada amostra foi extraído do tecido da parte interna do cisto com o kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

4.1.3. Amplificação de sequências de *cox1* a partir de isolados de *E. vogeli*

Um segmento de 396 pb do gene *cox1* foi amplificado por PCR a partir de DNA de cada uma das amostras de isolados de *E. vogeli*. A PCR foi realizada de acordo com protocolo de Bowles et al. (1992), com modificações na concentração de reagentes de acordo com Sanchez et al. (2010) (tabela 1) e com as condições de ciclagem descritas em Santos et al. (2012) (tabela 2). Os iniciadores utilizados foram os desenhados inicialmente para regiões conservadas de *cox1*, sendo eles o iniciador direto (CO1F) 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3', e reverso (CO1R), 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'. Os amplicons gerados foram purificados usando o kit de DNA de PCR illustra™ GFX™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. Ambas as fitas (direta e reversa) de cada amplicom foram sequenciadas usando os mesmos iniciadores de PCR e o kit de sequenciamento de ciclo Prim™ ABI BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O sequenciamento dos amplicons foi realizado pelo método de Sanger, em sequenciador automatizado de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Tabela 1 - Reagentes, concentrações e volumes utilizados na PCR para o gene *cox 1*

REAGENTES E CONCENTRAÇÃO DE USO	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME UTILIZADO NA REAÇÃO (µL)
Água ultrapura	q.s.p. p/** 50 µl	26,2-29,2
Tampão (10X)*	1X	5,0
MgCl ₂ (50 mM)*	2,5 mM	2,5
dNTPs (mistura 2mM)*	0,2 mM ou 200 µM	5,0
Iniciador CO1F 20 pmol	1 pmol/µl	2,5
Iniciador CO1R 20 pmol	1 pmol/µl	2,5
Taq DNA Polimerase (5 U/µl)*	1,5 U/µl	0,3
Conteúdo extraído (DNA total)	variada***	3,0-6,0

Legenda: * Invitrogen (Brasil); ** q.s.p. p/=quantidade suficiente para;*** 0,128-6,100 ng/µL (PCR com 3,0 µL) e 0,253-12,200 ng/µL (PCR com 6,0 µL).

Tabela 2 - Condições de tempo e temperatura utilizadas na PCR para o gene *cox 1*.

			Total de ciclos	
Etapa 1	<i>Hot Start</i>	Desnaturação a 94°C por 4 minutos	1	
Etapa 2	Ciclo 1			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	55°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 3	Ciclo 2			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	54°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 4	Ciclo 3			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	53°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 5	Ciclo 4			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45s	52°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 6	Ciclo 5			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	51°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 7	Ciclo 6			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	50°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 8	Ciclo 7			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	49°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 9	Ciclo 8			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	48°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 10	Ciclo 9			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	47°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 11	Ciclo 10			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	46°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 12	Ciclo 10			20
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45 s	45°C / 45 s	72°C / 45 s	
Etapa 13	Extensão final	Alongamento a 72°C por 7 min	1	

4.1.4. Análise *in silico* de sequências de DNA

No processamento *in silico* das sequências geradas, as sequências correspondentes aos iniciadores foram removidas e consensos para as fitas direta e reversa foram atribuídos com SeqMan v. 7.1 (DNASTAR, Madison, USA).

Para a análise, quarenta e nove sequências de *cox1* de 396 pb (32 sequências de *E. vogeli* deste estudo e 17 sequências provenientes do *GenBank*, incluindo 5 sequências de *E.vogeli* e 12 sequências representando 9 espécies do gênero *Echinococcus* foram incluídas na reconstrução da árvore filogenética Bayesiana sob o modelo coalescente, inferida em BEAST v. 1.8 (Drummond et al., 2012). Três corridas independentes foram realizadas por 5×10^7 gerações, amostrando a cada 50.000 gerações. A convergência dos parâmetros e a mistura adequada das cadeias MCMC foram confirmadas através do cálculo de tamanhos amostrais efetivos (ESS) em Tracer v. 1.6, (Rambaud et al., 2014) as quais estimativas com ESS acima de 10^4 foram consideradas confiáveis (Drummond & Bouckaert, 2015). O modelo de melhor ajuste de substituição de nucleotídeos foi determinado com jModeltest v. 2 (Darriba et al., 2012). Índices de diversidade molecular de número de sítios segregantes (S), número de haplótipos (NH), diversidade haplotípica (HD) e diversidade nucleotídica (π) foram computados no DnaSP v. 5 (Librado & Rozas, 2009) para cada localidade, bem como desvios da neutralidade, a partir dos testes de Fu's F_s (Fu, 1997) e Tajima D (Tajima, 1989). As divergências entre as sequências foram calculadas no Mega-X (Kumar et al., 2018). Uma rede de haplótipos a partir do modelo de median-joining (Bandelt et al., 1999) foi construída no Network v. 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 2008) para uma melhor visualização das relações entre os haplótipos de *cox1*.

4.2. Padronização e validação do teste imunoenzimático

4.2.1. Obtenção de amostras

Todas as etapas deste projeto foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (número de parecer 951.364). O transporte das amostras de soro do local de coleta até os laboratórios da Fiocruz (INCQS e LRNH) foi realizado por via aérea, cumprindo as exigências da legislação vigente para envio de material biológico.

As amostras de soros para controles positivos foram obtidas de 43 pacientes diagnosticados com equinococose policística. A coleta e a utilização desses soros foram submetidas ao CEP da FUNDHACRE e aprovado pelo parecer nº 146/2008.

Os critérios de inclusão (em conjunto) dos pacientes no estudo foram:

- Paciente ter sido submetido à método de imagem, no qual se evidenciou a presença de lesões císticas com calcificações periféricas;
- Paciente que tenha apresentado diagnóstico sorológico positivo para equinococose (imunoblot usando preparações antigênicas do fluido hidático de *E. granulosus*);
- Paciente com história epidemiológica que inclui habitação atual ou pregressa em área de floresta tropical e/ou prática de caça de subsistência e/ou presença de cães no peri-domicílio;
- Paciente aceitar participar do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo I).

Soros de 231 indivíduos sadios provenientes de áreas endêmicas do estado do Acre também foram incluídos como controles negativos neste estudo. Todos os doadores não possuíam sintomas sugestivos de equinococose, não apresentavam queixas quanto ao seu estado de saúde no momento da coleta e assinaram TCLE (anexo II) autorizando o uso de seus soros para fins de pesquisa, além de terem preenchido uma ficha epidemiológica com informações importantes (anexo III). Além disso, foram testados 3 soros de pacientes com cisticercose, 3 soros de pacientes com ascaridíase, 2 soros de pacientes com

esquistosomose mansônica, 2 soros de pacientes com estrogiloidíase, 1 soro de paciente com ancilostomíase e 1 soro de paciente com himenolepíase. Esses soros foram gentilmente cedidos pelo Dr. José Mauro Peralta, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.2.2. Clonagem, expressão e purificação dos antígenos recombinantes rAgB8/1 e rAgB8/2

Dois antígenos recombinantes foram utilizados neste estudo, ambos consistindo em subunidades de 8 kDa do AgB (rAgB8/1 e rAgB8/2) (Fernandez et al., 1996). Estes foram clonados previamente e produzidos a partir de vetores plasmidiais da série pGEX (Amersham), em linhagem de *Escherichia coli* BL21 (Amersham, Uppsala, Suécia) e/ou BL21 Codon PlusRil (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). As condições utilizadas para clonagem, cultivo e indução da expressão dos antígenos recombinantes em *E. coli* foram as descritas por Rott et al. (2000). Os antígenos recombinantes, expressos como proteínas de fusão com glutationa-S-transferase (GST), foram purificados por cromatografia de afinidade de acordo com Smith & Johnson (1988). As porções das proteínas de fusão correspondentes aos antígenos rAgB8/1 e rAgB8/2 foram recuperadas por clivagem com trombina (10 U/mg de proteína de fusão) por 14 h em temperatura ambiente. As concentrações das proteínas recuperadas foram determinadas por espectrofotometria (Johnstone & Thorpe, 1982).

4.2.3. Ensaio imunoenzimático (enzyme linked immunosorbent assay (ELISA))

Os ELISAs foram realizados como descrito por Virgínio et al. (2003), com modificações. As placas de microtitulação com 96 poços (Maxisorp, Thermo scientific, Nunc, USA) foram sensibilizadas por adsorção física com os antígenos recombinantes produzidos e diluídos em solução tamponada carbonato-bicarbonato (15 mM Na₂CO₃; 35 mM NaHCO₃; pH 9,6) no volume de 100 µL/poço. A quantidade ideal dos antígenos por poço foi testada para padronização da técnica (0,1 a 0,4 µ/poço) e foi determinada pela quantidade mais baixa a demonstrar positividade da reação para qualquer diluição de soros-controlados positivos testados. Após a sensibilização das placas com o antígeno, as

mesmas foram incubadas por 14 a 16 h, a 4°C. Os poços das microplacas sensibilizadas foram lavados 3 vezes com solução PBS-Tween 0,05% (0,01 M PBS pH 7,4; 0,05% Tween 20). Ligações não-específicas foram bloqueadas por incubação das placas durante 120 min a 37°C com *Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer* (blotto). A concentração de blotto (g de leite em pó em 100 ml de PBS1X) ideal foi testada em quatro concentrações diferentes (2,5%, 5%, 7,5% e 10%). As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,05%. Em cada poço sensibilizado foram adicionados 100 µl de amostras de soro diluídas em blotto (em triplicata). Foram testadas diversas diluições (1:50 a 1:800) e a diluição ótima dos soros foi definida como aquela que proporcionou a maior diferença entre as leituras de soros-controle positivos e negativos na concentração ótima estabelecida para o antígeno (Dantas et al., 2008). As placas foram incubadas durante 90 min a 37°C e após 3 lavagens com PBS-Tween 0,05%, foi então adicionado conjugado anti-IgG humana-peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído em blotto/PBS1X 10%. Diversas concentrações do conjugado anti-IgG foram testadas (1:1000 a 1:20000). Após incubação de 60 min a 37°C e 3 lavagens com PBS-Tween 0,05%, foi adicionado em cada poço 0,1 mL de solução cromógena [OPD, 0,035g em tampão citrato-fosfato (0,2 M Na₂HPO₄, 0,1 M C₆H₈O₇) e 0,15 % de peróxido de hidrogênio, como substrato para a enzima. Nesta etapa, a incubação foi de 15 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em todos os testes foram incluídos brancos com e sem o conjugado anti-IgG humana-peroxidase. A reatividade foi avaliada espectrofotometricamente através das leituras de densidade óptica (DO) em comprimento de onda de 492 nm, após a adição de uma solução de paragem (H₂SO₄, 1N). O valor de DO considerado representa a média de pelo menos duas leituras para cada soro, apresentando variação de no máximo 10% entre elas.

4.2.4. Determinação de variações intra-ensaio e interensaios

O cálculo dos coeficientes de variação foi feito seguindo o protocolo de Flores et al. (2016). Para determinação do coeficiente de variação intra-ensaio (CVIAE) e determinação do desvio dentro da mesma placa, DOs de dez amostras foram medidas dez vezes cada, na mesma placa de ensaio. O cálculo

do CVIAE foi feito dividindo-se o desvio padrão (DP) das dez medições pela média destas, e o valor obtido foi multiplicado por 100. Para determinação do coeficiente de variação inter-ensaio (CVIEE) e determinação do desvio entre diferentes placas, DOs de dez amostras foram medidas em cinco placas diferentes. O cálculo do CVIEE foi feito dividindo-se o DP das dez medições pela média destas, e o valor obtido foi multiplicado por 100. Para a análise dos resultados de precisão, utilizamos os critérios de aceitação para a validação de ensaios do FDA (USDHHS-FDA, 2001).

4.2.5. Análises estatísticas

A análise dos dados foi realizada através de dois critérios principais: a discriminação entre as amostras positivas e negativas para *E. vogeli* e os valores de densidade ótica (DO). Para a interpretação da soropositividade, os valores limiares (*cut-offs*) foram calculados para cada antígeno com base nas curvas de *Receiver Operating Characteristic* (ROC) (Hanley & McNeil, 1982). Os níveis de sensibilidade foram plotados contra os níveis de especificidade (-1) em cada ponto de corte em uma curva ROC. Os valores limiares utilizados foram aqueles que deram a maior soma de sensibilidade (%) e especificidade (%), conforme descrito por Amagai et al. (1999). A área sob a curva ROC (ASC) foi o parâmetro usado para definir os valores discriminatórios dos antígenos (entre indivíduos com e sem a doença).

O cálculo do índice crítico z para observações pareadas foi usado para testar as diferenças entre as ASCs (Hanley & McNeil, 1982) e o teste de aderência de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a distribuição específica das amostras. Pelo cálculo do índice crítico z , foi possível avaliar se a diferença nas áreas sob duas curvas ROC derivadas do mesmo conjunto de soros é aleatória ou real; um valor de z de 1,96 é tomado como evidência de que dois antígenos não são significativamente diferentes (Hanley & McNeil, 1982).

Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando os programas estatísticos GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA), e SPSS versão 25.0 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp).

5. RESULTADOS

Capítulo I

Genetic diversity of *Echinococcus vogeli* in the Western Brazilian Amazon

Artigo aceito para publicação em 02/09/2019 na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Este primeiro capítulo da seção de resultados refere-se aos ensaios feitos para a caracterização molecular de 32 amostras de cistos hidáticos de *E. vogeli* provenientes de excisões cirúrgicas de pacientes humanos e corresponde ao objetivo específico 1.

Genetic diversity of *Echinococcus vogeli* in the western Brazilian Amazon

Daniel Daipert-Garcia¹, Márcio Galvão Pavan², Leandro Batista das Neves¹, Fernanda Barbosa de Almeida¹, Nilton Ghiotti Siqueira^{3,4}, Guilherme Brzoskowski Santos⁵, Henrique Bunselmeyer Ferreira⁶, Rosângela Rodrigues-Silva¹

¹ Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³ Fundação Hospital Estadual do Acre, Acre, Brasil.

⁴ Universidade Federal do Acre, Acre, Brasil.

⁵ Laboratório de Biologia Molecular de Cestóides, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁶ Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

+ Corresponding author: Rosângela Rodrigues e Silva. Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Email: rosanrsilva@gmail.com.

Orcid ID: 0000-0002-6420-3400.

Abstract

Human polycystic echinococcosis is a parasitic infection caused by the larval stage of *Echinococcus vogeli*, which occurs in rural areas of Central and South America. Until now, little information on the genetic variability of *E. vogeli* is available. Here, 32 samples from human-excised *E. vogeli* cysts had a 396-bp sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene sequenced and compared to another 17 COI sequences representing 9 *Echinococcus* species. A Bayesian COI tree revealed that all *E. vogeli* sequences formed a monophyletic and well-supported clade with an *E. vogeli* reference sequence. The occurrence of geographically restricted *E. vogeli* COI haplotypes suggests retention of ancestral polymorphisms with little migration in Acre, Brazil.

Key words: *Echinococcus vogeli* – Polycystic echinococcosis – Genetic diversity -
Cytochrome oxidase I – Population genetics

Sponsorship: This study was funded by the Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

In Brazil, despite significant improvements in sanitary conditions observed in the last decade, there are still several parasitic diseases with high prevalence, especially in less developed areas.⁽¹⁾ Echinococcosis is a parasitic disease included in the list of neglected tropical diseases by the World Health Organization,⁽²⁾ and two forms of this anthrozoosis are prevalent in Brazil, cystic echinococcosis (CE) in the South,⁽³⁾ and polycystic echinococcosis (PE) in the North.⁽⁴⁾ The different forms of echinococcosis are caused by the larval stages (metacestodes) of flatworms belonging to the genus *Echinococcus* Rudolphi, 1801 (Cestoda; Taeniidae), which infect humans and other mammals. They grow as one or multiple cysts or vesicles located most often in the liver and lungs of intermediate hosts.⁽⁵⁾

Echinococcus vogeli is the etiological agent of PE, which is endemic in the Neotropical region, including the North Region of Brazil, and has a significant impact in terms of morbidity and mortality in the affected human populations.⁽⁶⁾ Medium-sized rodents are the intermediate hosts, and dogs (wild or domestic) are the definitive hosts of *E. vogeli*.⁽⁷⁾ The total number of human cases of PE reported (220 until 2015) is probably only a small fraction of the current infections, since several countries where the disease occurs do not have cumulative reporting and there is still considerable difficulty in the diagnosis and treatment of the disease, primarily in remote places.^(8,9)

Studies on molecular genetics and evolutionary ecology combined with traditional taxonomy based on morphological characters have an essential role in understanding the biodiversity of the *Echinococcus* genus and the differentiation of species. It is estimated that the ancestral node of the genus *Echinococcus* dates from ~6 million years ago. Previous reports on the genus *Echinococcus* evolutionary history

showed that Neotropical *E. vogeli* and *Echinococcus oligarthra* (the etiological agent of unicystic echinococcosis) were the first to diverge within the clade. They reached South America after the formation of the Isthmus of Panama, along with the immigration of wild canids and felids from North America.⁽¹⁰⁾

It has been recognized that intraspecific genetic variations can influence several factors in parasites, such as life cycle patterns, host specificity, development time, transmission dynamics, sensitivity to chemotherapeutics, antigenicity, and disease-causing ability⁽⁵⁾. The elucidation of intraspecific genetic variation has greatly contributed to the characterization of local populations and has allowed a better understanding of the parasite-host relationship and clinical manifestations of the disease, serving as the basis for the identification of important antigens and the development of immunodiagnostic assays and vaccines.⁽¹¹⁾

Intraspecific or strain variations are considered a common feature of the genus *Echinococcus* and have been mainly characterized in *Echinococcus granulosus* sensu lato (the etiological agent of CE) and *Echinococcus multilocularis* (etiological agent of alveolar echinococcosis).⁽¹⁰⁾ Several mitochondrial genetic variants differing in epidemiologically relevant characters have been described in these species.⁽¹²⁾ However, for the Neotropical *Echinococcus* species (*E. vogeli* and *E. oligarthra*), little is known regarding intraspecific genetic variation. Therefore, to provide information on possible genetic variation in *E. vogeli*, we surveyed the genetic variability of metacestodes from PE patients. The survey was based on a 396-bp mitochondrial DNA sequence from the cytochrome-C-oxidase subunit 1 gene (COI), widely used in molecular studies of the genus *Echinococcus*.⁽¹³⁾

Thirty-two human isolates of surgically excised *E. vogeli* cysts (Supplementary Table 1) were obtained from PE patients located in eight municipalities of the State of Acre, Brazil (Supplementary Figure 1 and Table 1). The surgical procedure was part of the treatment and all samples (cysts) were collected with the patients' agreement, according to the ethical standards of the Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil and to the Helsinki Declaration of 1975 (revised in 2008).

Cysts were provisionally stored at - 20°C just after the surgical procedure and defrosted for molecular analysis. For each sample, total DNA was extracted from germinal membranes using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. A 396-bp sequence of the COI sequence gene was amplified by PCR from each *E. vogeli* isolate DNA sample. PCR was performed according to Bowles *et al.*⁽¹⁴⁾, with modifications in reagent concentrations according to Sanchez *et al.*⁽¹⁵⁾ and cycling conditions as described in Santos *et al.*⁽¹⁶⁾. The amplicons were purified using the illustra™GFX™ PCR DNA kit (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), following the manufacturer's instructions. Both DNA strands were sequenced using the same PCR primers and the Prim™ ABI BigDye Terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), according to the manufacturers protocol. Sanger sequencing of amplicons was performed with an automated DNA sequencer ABI 3730 analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Primer sequences were removed and a consensus sequence from the forward and reverse strands was assigned with SeqMan v. 7.1 (DNASTAR, Madison, USA).

Forty-nine 396-bp COI sequences (32 *E. vogeli* sequences from this study, and 17 COI sequences from GenBank representing 9 *Echinococcus* species (Figure 1 legend) were included in the Bayesian phylogenetic tree reconstruction under the coalescent

model inferred in BEAST v. 1.8.⁽¹⁷⁾ Three independent runs were performed for 5×10^7 generations, sampling every 50,000 generations. Convergence of parameters and proper mixing were confirmed through the calculation of effective sample sizes (ESS) in Tracer v. 1.6,⁽¹⁸⁾ ESS estimates above 10^4 were considered reliable.⁽¹⁹⁾ The best-fit model of nucleotide substitution was determined with jModeltest v. 2.⁽²⁰⁾ Molecular diversity indices of the number of segregating sites (S), the number of haplotypes (N_H), haplotype diversity (H_D) and nucleotide diversity (π) were computed in DnaSP v. 5⁽²¹⁾ for each sampling site, as well as deviations from neutrality, with Fu's F_s ⁽²²⁾ and Tajima's D ⁽²³⁾ tests. Sequence divergence between populations was calculated in Mega-X.⁽²⁴⁾ A median-joining network⁽²⁵⁾ was constructed with Network v. 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 2008) for a better visualization of the relationships between COI haplotypes.

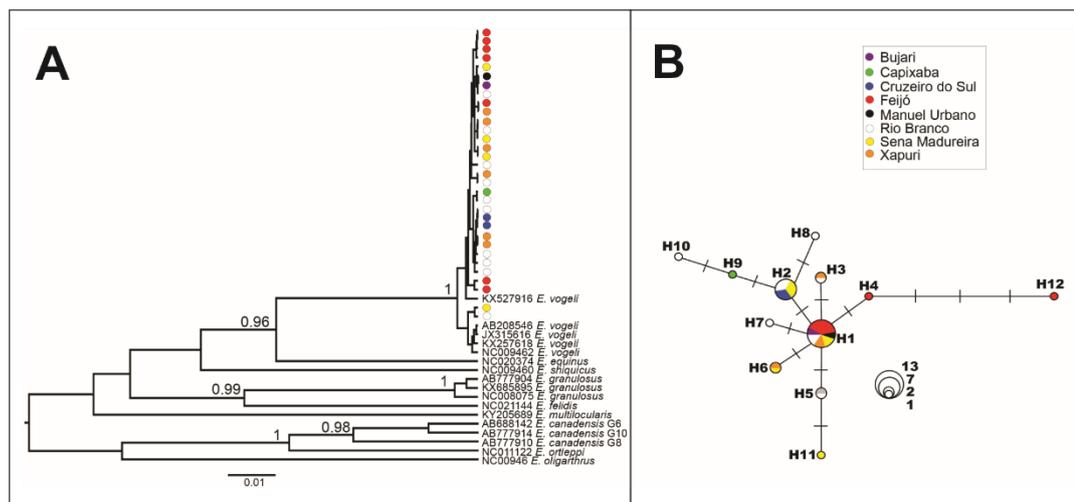


Figure 1- A- Bayesian maximum clade credibility tree reconstructed using a 396-bp COI sequence of 49 *Echinococcus* specimens. GenBank accession numbers of *E. vogeli* sequences generated in this study: MK791154 to MK791185. The accession number of sequences retrieved from GenBank are shown in branch tips. Posterior probabilities above 0.9 are show for key nodes. B - Haplotype network based on COI sequences. Circle sizes are proportional to haplotype frequency. Each dash represents a mutational step.

The Tamura and Nei model with four gamma categories (TrN+ Γ) was selected as the best evolutionary model for the data, following the Akaike and Bayesian information criteria. The Bayesian COI tree (Fig 1A) revealed that all *Echinococcus* sample sequences generated in this study formed a monophyletic and well-supported clade with an *E. vogeli* reference sequence (KX527916), further corroborating the species identity of the collected samples. This phylogenetic reconstruction disclosed short branches (i.e. low sequence divergence) among *E. vogeli* samples. Only two samples from Sena Madureira and Rio Branco clustered in a separate clade (PP = 1.0), along with another four *E. vogeli* sequences retrieved from GenBank (AB208546, JX315616, KX257618 and NC009462).

The molecular divergence of *E. vogeli* samples varied between zero and 0.8%, as expected for intraspecific comparisons. The most divergent sequence was from Capixaba (0.25-0.69%) and the least divergent sequence was from Bujari (0.10-0.27%). Inspection of the sequences revealed 12 polymorphic sites and 12 haplotypes, with five haplotypes (H1-H3, H5 and H6) shared between different localities (Fig 1B). Molecular diversity indices (Table 1) showed high haplotype diversity in three localities ($H_D = 0.833-0.911$) and nucleotide diversity ($H_D = 0.0025-0.0044$) comparable to *E. vogeli* COI data obtained in a previous study ($H_D = 0.0027-0.0044$).⁽¹⁶⁾

Table 1: COI-based molecular diversity indices for the *E. vogeli* samples collected in eight localities of the State of Acre, Brazil.

Locality	Geographical Coordinates	N	S	N _H	H _D	Π	Haplotypes
Bujari	67° 57' 08" W, 9° 49' 50" S	1	0	1	0	0	H1
Capixaba	67° 40' 33" W, 10° 34' 22" S	1	0	1	0	0	H9
Cruzeiro do Sul	72° 40' 12" W, 7° 37' 51" S	2	0	1	0	0	H2
Feijó	70° 21' 14" W, 8° 9' 50" S	7	4	3	0.524 (± 0.21)	0.0034 (± 0.002)	H1, H4, H12
Manuel Urbano	69° 15' 36" W, 8° 50' 20" S	1	0	1	0	0	H1
Rio Branco	67° 48' 30" W, 6° 58' 32" S	10	7	7	0.911 (± 0.08)	0.0044 (± 0.009)	H1, H2, H3, H5, H7, H8, H10
Sena Madureira	68° 39' 28" W, 09° 04' 02" S	6	4	4	0.867 (± 0.13)	0.0039 (± 0.001)	H1, H2, H6, H11
Xapuri	68° 30' 16" W, 10° 39' 06" S	4	2	3	0.833 (± 0.22)	0.0025 (± 0.009)	H1, H3, H6
<i>E. vogeli</i> (this study)		32	12	12	0.796 (± 0.06)	0.0037 (± 0.001)	

N: Sample size; S: Number of segregating sites; N_H: number of haplotypes; H_D: haplotype diversity; π: nucleotide diversity.

Haplotypes derived from the COI sequences disclosed a network (Fig 1B) with weak geographic structure, since localities that are close and far apart (50-650km) share the same haplotypes. The network had two central haplotypes (H1 and H2) that were very abundant and widespread, and to which seven other less common haplotypes were closely related (1 mutational step). The most frequent haplotype (H1, N = 13) was shared with specimens from all localities, except for Capixaba. The other common haplotype (H2, N = 7) was shared with specimens from Cruzeiro do Sul, Rio Branco and Sena Madureira. These geographically restricted haplotypes suggest sudden population expansion or retention of ancestral polymorphism with little migration. Since neutrality tests did not indicate significant departures from neutrality ($P > 0.05$), it is highly probable that the weak geographic structure of the network reflects retention of ancestral polymorphisms and restricted gene flow in Acre, Brazil.

High genetic variability and overall low levels of genetic structure have been shown for species of the *Echinococcus* genus. For instance, Sharma *et al.*⁽²⁶⁾ described a high genetic diversity with low to high levels of genetic differentiation within populations of *E. granulosus* sensu stricto(s.s) from diverse geographical origins of all continents.

Previous studies on species that are transmitted in wildlife cycles, such as *E. vogeli* from Brazil,⁽¹⁶⁾ *E. multilocularis* from North America and Europe,⁽²⁷⁾ and Tibetan *Echinococcus shiquicus*⁽¹¹⁾ reported higher nucleotide diversity (0.0044-0.0055) when compared to species transmitted to livestock animals, as *Echinococcus ortleppi* collected in five African countries and Brazil (0.0001-0.0008)⁽²⁸⁾ and *E. granulosus* s.s. from China, Peru, Eastern Europe and Italy (0.0002-0.0055).⁽¹¹⁾ While the species with wild-life cycles seem to retain ancestral polymorphisms, those with domestic cycles show signs of genetic homogenization due to animal transportation and introduction of small founder populations.⁽¹⁰⁾

To date, there is little information on the genetic structure of *E. vogeli*. The study of parasites in wild animals is laborious and sample collection in places with difficult access and with inadequate sanitary conditions lead to a great gap of knowledge concerning both the parasite and the disease. Our results differ from a previous study, in which a more comprehensive genetic structure was verified in populations from different Amazonian Brazilian States.⁽¹⁶⁾ However, it is noteworthy that our sampling strategy included a more restricted geographical area. New sampling strategies are required to provide a better picture of the *E. vogeli* population dynamics in the Amazon.

Overall, our results showed that *E. vogeli* has undergone little migration in Acre and the presence of shared haplotypes among different populations seems to reflect the retention of ancestral polymorphisms. To the best of our knowledge, this is only the second study in the literature on the genetic structure and variability of *E. vogeli* populations. A better understanding of the dynamics, genetic structure and diversity of this species should help the diagnosis, epidemiology, and prevention of the disease, and contribute to taxonomical and evolutionary studies.

Acknowledgements

We thank Samanta Cristina das Chagas Xavier (Oswaldo Cruz Institute - IOC/Fiocruz-RJ) for helping prepare the map.

Author's contribution

DDG, HFB and RRS - Conceived the study and designed the experiments; DDG, LBN and TPDC - carried out DNA extraction from the biological specimens and performed the PCR; NGS - provided the samples; FBA, MGP and GBS - analyzed the sequences and performed phylogenetic analysis; DDG, MGP, HFB and RRS - drafted the manuscript. All authors critically revised the manuscript for intellectual content and approved the final version.

References

1. Gazzinelli A, Correa-Oliveira R, Yang GJ, Boatman BA, Kloos H. A research agenda for helminth diseases of humans: social ecology, environmental determinants, and health systems. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(4): e1603-11.
2. Parija S, Giri S. A review on diagnostic and preventive aspects of cystic echinococcosis and human cysticercosis. *Trop Parasitol*. 2012; 2(2): 99-108.
3. Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, Torgerson PR, Harandi MF, Romig T, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis. *Adv Parasitol*. 2017; 95: 315-493.
4. Bittencourt-Oliveira F, Teixeira P, Alencar A, Menezes R, Corrêa C, Neves L, et al. First parasitological, histopathological and molecular characterization of *Echinococcus vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 from *Cuniculus paca* Linnaeus, 1766 in the Cerrado biome (Mato Grosso do Sul, Brazil). *Vet Parasitol*. 2018; 250: 35–9.
5. Thompson RCA. Biology and systematics of *Echinococcus*. *Adv Parasitol*. 2017; 95: 65-109.
6. D'Alessandro A, Rausch RL. New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21(2): 380–401.
7. Eckert J, Thompson RCA. Historical aspects of echinococcosis. *Adv Parasitol*. 2017; 95: 1-64.
8. Mayor P, Baquedano LE, Sanchez E, Aramburu J, Gomez-Puerta LA, Mamani VJ, et al. Polycystic echinococcosis in Pacas, Amazon region, Peru. *Emerging Infect Dis*. 2015; 21(3): 456–9.

9. Stijnis K, Dijkmans AC, Bart A, Brosens LAA, Muntau B, Schoen C, et al. *Echinococcus vogeli* in immigrant from Suriname to the Netherlands. *Emerging Infect Dis.* 2015; 21(3): 528–30.
10. Lymbery AJ. Phylogenetic pattern, evolutionary processes and species delimitation in the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol.* 2017; 95: 111-145.
11. Nakao M, Li T, Han X, Ma X, Xiao N, Qiu J, et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Int J Parasitol.* 2010; 40(3): 379–85.
12. Wen H, Vuitton L, Tuxun T, Li J, Vuitton DA, Zhang W, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 32(2): 1-39.
13. Siles-Lucas M, Casulli A, Conraths FJ, Müller N. Laboratory diagnosis of *Echinococcus* spp. in human patients and infected animals. *Adv Parasitol.* 2017; 96: 159-257.
14. Bowles J, Blair D, Mcmanus D. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 54(2): 165–73.
15. Sánchez E, Cáceres O, Náquira C, Garcia D, Patiño G, Silvia H, et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(6): 806–10.
16. Santos GB, Soares M do CP, de F Brito EM, Rodrigues AL, Siqueira NG, Gomes-Gouvêa MS, et al. Mitochondrial and nuclear sequence polymorphisms reveal geographic structuring in Amazonian populations of *Echinococcus vogeli* (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol.* 2012; 42(13–14): 1115–8.

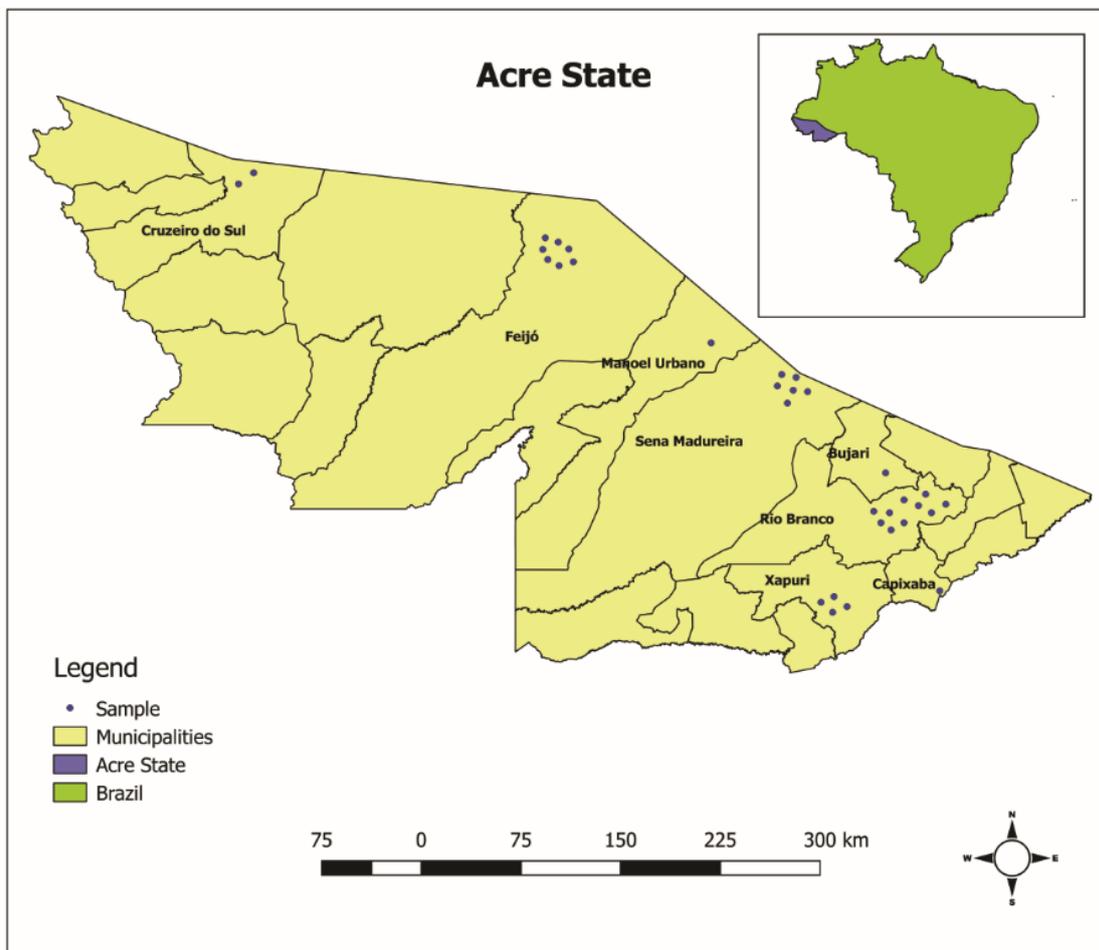
17. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012; 29(8): 1969–73.
18. Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ (2014) Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
19. Drummond AJ, Bouckaert RR. *Bayesian Evolutionary Analysis with BEAST*. 1 ed. Cambridge University Press; 2015: 260 pp.
20. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 2012; 9(8): 772.
21. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009; 25(11): 1451–2.
22. Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* 1997; 147(2): 915–25.
23. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989; 123(3): 585–95.
24. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6): 1547–9.
25. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999; 16(1): 37–48.
26. Sharma M, Fomda BA, Mazta S, Sehgal R, Singh BB, Malla N. Genetic diversity and population genetic structure analysis of *Echinococcus granulosus* sensu stricto complex based on mitochondrial DNA signature. *PLoS ONE.* 2013; 8(12): e82904-8.

27. Spotin A, Boufana B, Ahmadpour E, Casulli A, Mahami-Oskouei M, Rouhani S, et al. Assessment of the global pattern of genetic diversity in *Echinococcus multilocularis* inferred by mitochondrial DNA sequences. *Vet Parasitol.* 2018; 262: 30–41.
28. Addy F, Wassermann M, Banda F, Mbaya H, Aschenborn J, Aschenborn O, et al. Genetic polymorphism and population structure of *Echinococcus ortleppi*. *Parasitology.* 2017; 144(4): 450–8.

Supplementary Table 1. Characteristics of patients from the State of Acre, Brazil, who had surgically excised *E. vogeli* cysts. F – Female; M – Male.

Sample ID	Sex	Age (surgery date)	Affected organ	Provenance
1	F	29	Liver	Sena Madureira
2	F	34	Liver	Capixaba
3	F	54	Liver	Rio Branco
4	M	51	Liver	Rio Branco
5	F	53	Liver	Cruzeiro do Sul
6	M	43	Liver	Sena Madureira
7	F	33	Liver	Rio Branco
8	F	31	Liver	Sena Madureira
9	M	40	Liver	Feijó
10	F	ND	Liver	Manuel Urbano
11	M	44	Liver	Xapuri
12	M	41	Liver	Feijó
13	M	38	Liver	Feijó
14	M	54	Liver	Sena Madureira
15	F	47	Liver	Xapuri
16	F	67	Liver	Feijó
17	F	58	Liver	Rio Branco
18	F	57	Liver	Rio Branco
19	F	63	Liver	Cruzeiro do Sul
20	F	73	Mesentery	Sena Madureira
21	F	67	Mesentery	Feijó

22	F	73	Liver	Rio Branco
23	F	40	Mesentery	Rio Branco
24	F	27	Liver	Bujari
25	F	53	Liver	Feijó
26	F	67	Liver	Rio Branco
27	M	53	Liver and Mesentery	Rio Branco
28	M	55	Mesentery	Xapuri
29	M	63	Liver	Xapuri
30	F	42	Liver	Feijó
31	F	59	Liver	Rio Branco
32	F	27	Liver	Sena Madureira



Supplementary Figure 1 - Map of Acre State, Brazil, showing the geographical origin of the collected *E. vogeli* samples.

Capítulo II

Padronização e validação de método imunodiagnóstico para a equinococose policística humana, baseado em antígenos recombinantes

Este segundo capítulo da seção de resultados refere-se aos ensaios feitos para a padronização e validação de um ELISA indireto para a detecção de anticorpos (IgGs totais) em soros de pacientes com EP e correspondem aos objetivos específicos 2 e 3. Para tal foram realizadas a produção dos antígenos recombinantes, a avaliação das melhores condições para o ELISA (padronização do teste) e a validação do teste frente a um painel de soros (43 soros positivos de pacientes com EP e 231 soros negativos de pacientes clinicamente saudáveis residentes em área endêmica).

5.1. Padronização e validação de método imunodiagnóstico para a EP

Os antígenos recombinantes, expressos como proteínas de fusão com GST foram purificados por cromatografia de afinidade e recuperados da proteína de fusão pela clivagem da trombina. Os rendimentos obtidos na produção dos antígenos recombinantes rAgB8/1 e rAgb8/2 foram medidos por espectrofotometria, sendo considerado satisfatórios, consistindo de 1,83 mg/L e 2,5 mg/L de cultura, respectivamente.

Na análise para o estabelecimento das melhores condições para o ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-rAgB8/1 e rAgb8/2 de *E. vogeli* em soro, foram avaliadas diferentes quantidades dos antígenos recombinantes e diluições distintas de blotto, conjugado e amostras. A quantidade mais baixa de antígenos para sensibilização da placa a apresentar positividade da reação frente às amostras positivas foi de 0,2 µg/ poço. A diluição de soro que permitiu maior diferença entre as absorvâncias obtidas de soros-controle positivos e negativos na concentração ótima estabelecida para o antígeno foi de 1:400, com conjugado anti igG humana-peroxidase na diluição de 1:15000 e blotto a 10%.

Posteriormente à padronização do ensaio imunoenzimático para cada antígeno recombinante, foram realizados testes com todos os soros individuais utilizados no presente estudo (43 soros positivos de pacientes com EP e 231 soros negativos de pacientes clinicamente saudáveis residentes em área endêmica). A resposta dos anticorpos anti-IgG frente aos antígenos recombinantes foi investigada separadamente para cada antígeno recombinante utilizado neste trabalho.

Com base nas absorvâncias obtidas, os melhores valores de *cut-off* foram calculados para ambos os antígenos recombinantes através da utilização de curva ROC (figura 8A e 8B). Os valores de *cut-off* para rAgB8/1 e rAgb8/2 foram de 0,1565 e 0,1030 respectivamente, representando a maximização da soma dos valores de sensibilidade e especificidade. Para comparação, foram calculadas as medianas ± desvio padrão para expressar os valores médios de densidade ótica do teste (Figura 9A e 9B). A sensibilidade do rAgB8/1 foi de 83,72% e a especificidade foi de 83,12% em comparação com 81,40% de

sensibilidade e 80,09% de especificidade para o rAgB8/2. O maior valor de área sob a curva (ASC) foi para AgB8/1 (0,9185), embora não tenha sido significativamente diferente ($z = 0,79$) da ASC para AgB8/2 (0,8915). Os dados de sensibilidade e especificidade e parâmetros relevantes obtidos através da curva ROC são apresentados na Tabela 3.

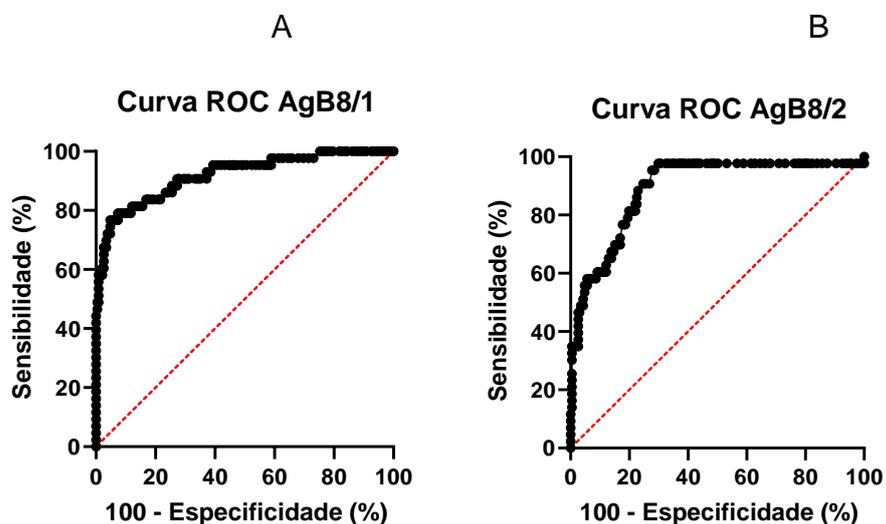


Figura 8. Curvas ROC utilizadas para determinar os valores de *cut-off* e as áreas sob curva para os dois antígenos recombinantes testados em IgG ELISA.

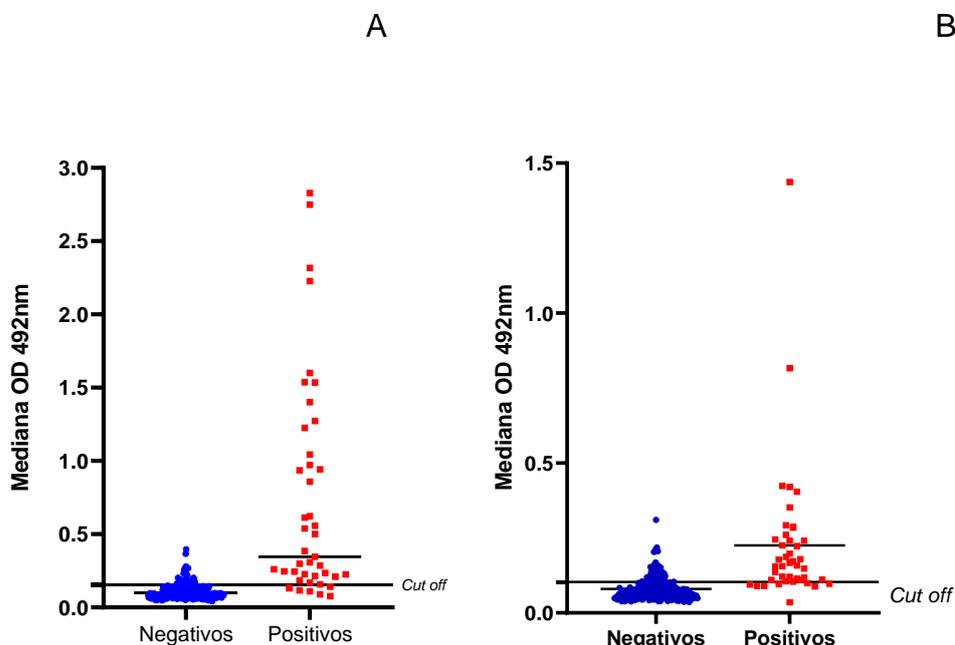


Figura 9. Gráficos representativos dos ELISAs com soros de pacientes com EP (quadrados) e de indivíduos saudáveis (círculos) frente aos antígeno rAgB8\1 (A) e rAgB8/2 (B). *Cut-offs*: rAgB8/1 = 0,1565 e rAgB8/2 = 0,1030. As barras horizontais nas distribuições das amostras representam a mediana destas.

Tabela 3 - Resumo dos parâmetros derivados das curvas ROC dos antígenos recombinantes testados em ELISA contra soros de pacientes positivos para EP e de indivíduos saudáveis.

Antígeno	ASC ± DP	IC (95%)	Cut-off	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
rAgB8/1	0,9185 ± 0,026	0,8679 - 0,9690	0,156	83,72	83,12
rAgB8/2	0,8915±0,028	0,8373 - 0,9458	0,103	81,40	80,09

Legenda: ASC = área sob a curva; DP = desvio padrão; IC = intervalo de confiança.

O cálculo da precisão dos testes foi expresso em função do coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaios. Para tal, avaliamos a DO de 10 amostras diferentes em 10 poços diferentes de uma mesma placa (precisão intra-ensaio) e de 10 amostras diferentes, distribuídas em 5 placas diferentes (precisão inter-ensaio). Para o teste de precisão inter-ensaio, os testes foram realizados em dias diferentes.

A precisão intra-ensaio para os testes com o antígeno rAgB8/1 teve CV entre 3,15 e 13,74%, com somente uma amostra apresentando CV maior que 10%, enquanto que, para os testes com o antígeno rAgB8/2, a variação ficou entre 2,44 e 10,25%, com somente uma amostra apresentando valor pouco acima de 10%. Já a precisão inter-ensaio para os testes com o antígeno rAgB8/1 teve CV entre 4,89 e 13,43%, não apresentando valores maiores que 15% para nenhuma amostra, enquanto que, para os testes com o antígeno rAgB8/2, a variação ficou entre 6,42 e 15,71%, com somente uma amostra apresentando valores de CV maiores que 15%. Tanto os valores de CVIAE quanto os valores de CVIEE satisfazem aos critérios aceitação para a validação de ensaios do FDA. Os valores dos coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios encontrados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 – Coeficientes de variação intra-ensaio

Soros	Elisa AgB8/1	Elisa AgB8/2
Média ODs ± DP (CVIAE)		
1	0,339 ± 0,017 (4,99)	0,475 ± 0,012 (2,44)
2	0,120 ± 0,004 (3,15)	0,129 ± 0,007 (5,16)
3	1,030 ± 0,072 (7,00)	0,103 ± 0,006 (5,60)
4	2,729 ± 0,201 (7,36)	0,062 ± 0,006 (9,35)
5	0,058 ± 0,002 (4,05)	0,043 ± 0,002 (5,02)
6	0,370 ± 0,035 (9,36)	0,175 ± 0,015 (8,80)
7	0,183 ± 0,013 (7,08)	0,167 ± 0,010 (6,12)
8	1,198 ± 0,165 (13,74)	0,692 ± 0,023 (3,34)
9	2,206 ± 0,152 (6,88)	0,141 ± 0,014 (10,25)
10	1,522 ± 0,106 (6,94)	0,232 ± 0,009 (3,67)

Tabela 5 – Coeficientes de variação inter-ensaio

Soros	Elisa AgB8/1	Elisa AgB8/2
Média ODs ± DP (CVIEE)		
1	0,562 ± 0,065 (11,59)	0,265 ± 0,029 (11,08)
2	0,123 ± 0,016 (13,19)	0,171 ± 0,012 (6,85)
3	1,161 ± 0,057 (4,89)	0,129 ± 0,016 (12,37)
4	3,043 ± 0,295 (9,68)	0,071 ± 0,009 (13,18)
5	0,060 ± 0,003 (5,32)	0,055 ± 0,004 (7,40)
6	0,337 ± 0,045 (13,43)	0,163 ± 0,015 (9,00)
7	0,158 ± 0,014 (8,87)	0,168 ± 0,015 (8,98)
8	1,078 ± 0,136 (12,63)	0,858 ± 0,055 (6,42)
9	1,913 ± 0,232 (12,11)	0,182 ± 0,029 (15,71)
10	1,730 ± 0,229 (13,26)	0,235 ± 0,031 (13,19)

Foi avaliada também a possível ocorrência de reações cruzadas e para tal utilizamos 11 soros positivos para outras parasitoses, incluindo outros cestóides. Destes, apenas 1 soro positivo para ascaridíase reagiu também a ambos os antígenos recombinantes testados. As especificidades dos testes frente aos soros positivos para outras parasitoses são apresentadas na Tabela 6. A especificidade foi calculada pela taxa entre o número absoluto de soros positivos entre os 11 soros de portadores de infecções helmínticas.

Tabela 6 - Resumo da especificidade de soros positivos para outras parasitoses obtidas em Elisa IgG contra os antígenos recombinantes AgB8/1 e AgB8/2.

Parasitose (número de soros testados)	Número de reações positivas	
	AgB8/1	AgB8/2
Cisticercose (3)	0	0
Ascaridíase (3)	1	1
Esquistossomose (2)	0	0
Estrongiloidíase (1)	0	0
Ancilostomíase (1)	0	0
Himenolepiíase (1)	0	0
Total (11)	1	1
Especificidade	90,9%	90,9%

Entre os 43 soros de pacientes considerados positivos para EP utilizados neste estudo, 7 apresentaram negatividade frente ao rAgB8/1 e 8 frente ao rAgB8/2, considerando a sensibilidade aferida para os *cut-offs* utilizados. No entanto, quando consideramos a negatividade frente à ambos os antígenos recombinantes rAgB8/1 e rAgB8/2, apenas um soro não mostrou reação em ELISA indireto para a detecção de anticorpos (IgGs totais). Esse resultado nos demonstra um aumento considerável na sensibilidade quando da utilização dos dois testes, atingindo aproximadamente 97,8%.

6. Discussão

Estudos sobre genética molecular e ecologia evolutiva associados à taxonomia tradicional baseada em caracteres morfológicos têm um papel essencial na compreensão da biodiversidade do gênero *Echinococcus* e na diferenciação de espécies. Estima-se que o nodo ancestral do gênero *Echinococcus* data de 5,8 milhões de anos atrás. Relatos prévios da história evolutiva do gênero *Echinococcus* mostraram que as espécies neotropicais, *E. vogeli* e *Echinococcus oligarthra* foram os primeiros a divergir dentro do clado. Eles chegaram à América do Sul após a formação do Istmo do Panamá, juntamente com a imigração de canídeos e felídeos selvagens da América do Norte (Lymbery, 2017).

É reconhecido que uma variação genética intra-específica pode influenciar em diversos fatores como: padrão de vida do parasito, especificidade para com o hospedeiro, tempo de desenvolvimento, dinâmica de transmissão, sensibilidade a quimioterápicos, antigenicidade e capacidade de provocar doença (Thompson, 2017). Esta variabilidade genética é comprovada em *E. granulosus*, e naquela espécie esta variabilidade possui importantes aplicações para o desenvolvimento de vacinas e drogas contra o parasito, além de permitir testes diagnósticos utilizando ferramentas moleculares, tudo isso trazendo informações valiosas, com impacto sobre a epidemiologia da doença causada pelo parasito (McManus & Bowles, 1996, Nakao et al., 2010; Sánchez et al., 2012).

Variações intraespecíficas ou linhagens são consideradas comuns no gênero *Echinococcus* e têm sido caracterizadas principalmente em *Echinococcus granulosus* s.l e *E. multilocularis* (Lymbery, 2017). Diversas variantes genéticas mitocondriais, diferindo em caracteres epidemiologicamente relevantes, têm sido descritas nestas espécies (Wen et al., 2019). Para as espécies do gênero *Echinococcus* neotropicais, no entanto, pouco se sabe sobre a variação genética intraespecífica. Portanto, para fornecer informações sobre possíveis variações genéticas em *E. vogeli*, estudamos a variabilidade genética de metacestóides de pacientes com EP. O levantamento realizado foi baseado em uma sequência de mtDNA de 396 pares de base (pb) do gene *cox1*,

amplamente utilizado em estudos moleculares do gênero *Echinococcus* (Siles-Lucas et al., 2017; Wen et al., 2019).

Analisando o perfil etário dos pacientes deste estudo em relação à análise molecular, a idade dos pacientes variou de 27 a 73 anos, com média de $49,5 \pm 13,3$ anos. Já com relação ao órgão afetado, 27 pacientes tiveram infecção pelos cistos no fígado, enquanto cinco pacientes tiveram o mesentério acometido pela doença, com 1 paciente tendo acometimento de ambos, informações que estão de acordo com os relatos para o gênero *Echinococcus* na literatura, que demonstram alta frequência (70% de casos de EC) de infecções no fígado (Thompson, 2017; Wen et al., 2019).

Existem poucos estudos epidemiológicos para espécies de *Echinococcus*, e estes geralmente se referem ao complexo *E. granulosus* (*E. granulosus* s.l.) e *E. multilocularis* (Deplazes et al., 2017). Além disso, mesmo em estudos epidemiológicos de *E. granulosus* e *E. multilocularis*, as estratificações de idade são relativamente escassas. Para as espécies neotropicais do gênero *Echinococcus* (*E. vogeli* e *E. oligarthra*), esses dados são ainda mais escassos. No entanto, é bem conhecido que os casos de EP e EC permanecem assintomáticos por anos, devido às baixas taxas de crescimento de cistos (Craig et al., 2017).

É comum que até mesmo pacientes infectados pelo parasito durante sua infância sejam diagnosticados apenas na vida adulta, muitas vezes por acaso, quando da execução de exames de imagem para outros fins. A ocorrência de casos em locais de difícil acesso e a precariedade dos serviços de saúde provavelmente também contribuem para o diagnóstico tardio da doença (Deplazes et al., 2017). Em geral, os fatores mencionados acima podem criar um viés para o diagnóstico de equinococose em adultos. No caso da equinococose policística, houve apenas um estudo com dados em quantidade razoável de pacientes relatados na literatura, contudo, assim como este estudo, não foi um estudo epidemiológico. Naquele estudo, realizado com 58 pacientes diagnosticados com equinococose policística, Siqueira et al. (2013) relataram que a idade dos pacientes variou de 7 a 81 anos, com média de $41,6 \pm 15,47$ anos, uma média relativamente próxima a que encontramos.

Já para analisarmos a variabilidade genética entre amostras de *E. vogeli*, as 32 amostras de cistos humanos deste estudo tiveram um amplicon do gene *cox1* sequenciado e foram comparadas com outras 17 sequências de *cox1* presentes no *Genbank*, incluindo as 5 sequências de *E. vogeli* e 12 representando outras 9 espécies do gênero *Echinococcus*. A árvore Bayesiana gerada revelou que todas as sequências formam um clado monofilético com uma sequência de referência de *E. vogeli* (KX527916), corroborando a identidade da espécie das amostras coletadas. Baixos valores de diversidade nucleotídica foram encontrados, sugerindo uma variabilidade genética bastante reduzida, resultado similar ao encontrado por Santos et al. (2012).

Esta reconstrução filogenética revelou baixa divergência de sequência (ramificações curtas na árvore) entre as amostras. Apenas duas amostras, de Sena Madureira e Rio Branco, agruparam-se em um clado separado (PP = 1,0), juntamente com outras duas sequências de *E. vogeli* recuperadas do GenBank (NC009462 e JX315616). A divergência molecular das amostras de *E. vogeli* variou entre zero e 0,8%, como esperado para comparações intraespecíficas. A sequência mais divergente foi a de Capixaba (0,25-0,69%) e a menos divergente foi a de Bujari (0,10-0,27%). A inspeção das sequências, por sua vez, revelou 12 sítios polimórficos e 12 haplótipos, sendo cinco (H1-H3, H5 e H6) compartilhados entre diferentes localidades. Os índices de diversidade molecular mostraram alta diversidade haplotípica (HD = 0,833-0,911) e nucleotídica (HD = 0,0025-0,0044) em três localidades), comparável aos resultados obtidos em estudo anterior (HD = 0,0027-0,0044) (Santos et al., 2012).

Os haplótipos derivados de sequências de *cox1* revelaram uma rede com fraca estrutura geográfica, uma vez que locais com distâncias variadas entre si (de 50 a 650 km) compartilham os mesmos haplótipos. A rede tem dois haplótipos centrais (H1 e H2), que são muito abundantes e difundidos e aos quais outros sete haplótipos menos comuns estão intimamente relacionados. O haplótipo mais frequente (H1, N = 13) é compartilhado com isolados de todas as localidades, com exceção de Capixaba. O outro haplótipo comum (H2, N = 7) é compartilhado entre isolados de Cruzeiro do Sul, Rio Branco e Sena Madureira. Esses haplótipos geograficamente restritos sugerem expansão repentina da população ou retenção de polimorfismo ancestral com pouca migração. Como

os testes de neutralidade não indicam desvios significativos ($P > 0,05$), é altamente provável que a fraca estruturação geográfica reflita a retenção de polimorfismos ancestrais e fluxo restrito de genes no Acre, Brasil.

O estudo de parasitos em animais silvestres é trabalhoso e a coleta de amostras em locais de difícil acesso e com condições sanitárias inadequadas levam a uma grande lacuna de conhecimento sobre o patógeno e a doença (Rodrigues-Silva et al., 2011). Este é apenas o segundo estudo sobre a estrutura e variabilidade genética das populações de *E. vogeli*. Nossos resultados diferem do único estudo anterior (Santos et al., 2012), no qual uma estruturação genética mais abrangente foi verificada em populações de diferentes estados brasileiros da região amazônica. No entanto, vale ressaltar que nossa estratégia de amostragem incluiu uma área geográfica mais restrita.

A pesquisa da diversidade genética está intimamente ligada a outros fatores relacionados ao parasito e à doença, como diagnóstico, desenvolvimento de vacinas e metodologias de controle e tratamento eficazes. Estudos morfológicos e biológicos permitem a identificação e o diagnóstico das espécies, no entanto, se demonstraram inconsistentes para se diagnosticar linhagens, o que torna essencial a distinção específica a nível genético (Sanchez et al., 2010). Nas infecções humanas, a identificação das espécies e linhagens de *Echinococcus* é complexa e baseia-se em uma combinação de critérios morfológicos, biológicos, bioquímicos, moleculares, exames de imagem e laboratoriais, além de características epidemiológicas (Lymbery & Thompson, 1988; Bowles et al., 1992; McManus, 2002; Lymbery, 2017).

Até o momento, várias abordagens têm sido descritas para o diagnóstico laboratorial e acompanhamento das infecções por *Echinococcus*, incluindo a detecção de anticorpos, antígenos e citocinas (Siles-Lucas et al., 2017). A complexidade da equinococose e a heterogeneidade de casos clínicos tornam necessária uma compreensão profunda das relações entre parasito-hospedeiro e o fenótipo do parasito em diferentes estágios de desenvolvimento para que se alcance a melhor ferramenta diagnóstica e para torná-la aceita na prática clínica. O diagnóstico da doença, feito de forma precoce, pode diminuir ou até mesmo impedir o agravamento da doença e os riscos ao paciente.

A pesquisa de marcadores imunológicos como antígenos e anticorpos contribui diretamente para o imunodiagnóstico da doença. A utilização de vários métodos em concomitância pode melhorar a eficácia dos métodos laboratoriais (Siles-Lucas et al., 2017), no entanto o diagnóstico da doença ainda se apresenta com especificidade e sensibilidade muito variáveis. Além disso, o uso de alguns métodos apresenta alto custo, inviabilizando o diagnóstico de grande parte da população, principalmente porque os locais de ocorrência desta doença geralmente são isolados e com sistema de saúde precário ou insuficiente (Ammann & Eckert, 1996; Siqueira et al., 2013; Kern et al., 2017).

A fonte antigênica mais amplamente utilizada para a detecção de anticorpos IgG específicos é o fluido hidático, porém a baixa concentração de componentes com valor diagnóstico e a presença de componentes determinantes de reatividade cruzada dificultam sua eficiência (Liance et al., 2000). Inúmeros estudos analisaram o uso de IgG-ELISA contra antígenos do fluido hidático para o diagnóstico de EC (Carmena et al., 2006; Sarkari & Rezaei, 2015; Manzano -Roman et al., 2015). As sensibilidades desses testes têm sido bastante diversas, com resultados variando entre 64,8% e 100% (Zhang & McManus, 2006, Wen et al., 2019).

A alta ocorrência de resultados falso-negativos provavelmente se deve a uma gama de fatores descritos por diferentes autores, e incluem a diferença de estágio cístico, inatividade cística, localização do cisto em órgãos que não o fígado, soros de pacientes em tratamento ou tratados, cistos pequenos e variabilidade da fonte antigênica (Rahimi et al., 2011; Hernandez-Gonzalez et al., 2012; Kilimcixoglu et al., 2013; Tamarozzi et al., 2013; Wang et al., 2013). A espécie ou genótipo do parasito também representa fonte adicional de potenciais resultados falso-negativos em testes sorológicos com fluido hidático. A variabilidade antigênica entre diferentes genótipos foi identificada por diversos autores, levando a diferentes desempenhos diagnósticos (Manzano-Roman et al., 2015).

Diversos antígenos purificados também já foram testados para a detecção de anticorpos em pacientes com EC, com destaque para o AgB e o Ag5. No entanto, desvantagens semelhantes às que são encontradas quando da utilização de fluido hidático são encontradas, provavelmente devido a resultados

falsos negativos atribuídos a variáveis clínicas já apontadas para a utilização do fluido hidático e variabilidades na sensibilidade e especificidade usando o mesmo antígeno purificado devido à falta de padronização dos métodos de purificação (Carmena et al., 2006 e Manzano-Roman et al., 2015).

Já o uso de antígenos recombinantes apresenta uma alternativa auxiliar viável para o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e específicos para o imunodiagnóstico da equinococose. Antígenos recombinantes têm a vantagem de produção intra-laboratorial de grandes quantidades de antígeno puro, dispensando o uso de animais e apresentando menor variação lote a lote quando comparados com antígenos brutos ou purificados (Robles et al., 2005).

A confirmação diagnóstica definitiva da EP, assim como a da EC, em hospedeiros humanos é feita somente a partir do exame histológico ou molecular dos cistos removidos cirurgicamente (Craig et al., 2017). No entanto, devido à dificuldade de obtenção de quantidade suficiente de soros provenientes desses pacientes, a construção de painéis para avaliação de testes sorológicos é feita considerando outros parâmetros de avaliação diagnóstica, como exames de imagem e histórico do paciente. Neste trabalho utilizamos um painel de soros com confirmação diagnóstica utilizando parâmetros variados. No entanto, todos os pacientes apresentavam histórico e exames de imagem compatíveis com a doença, além de imunoblot com reação positiva utilizando antígenos brutos de *E. granulosus*.

Os antígenos habitualmente utilizados para o diagnóstico de pacientes com EP têm sido os descritos em espécies de *Echinococcus* diferentes (D'Alessandro e Rausch, 2008). Até o atual momento, existem poucos antígenos derivados de *E. vogeli* publicados na literatura. Esta escassez de informações sobre antígenos também é encontrada no *GenBank*, nas quais apenas 54 entradas para proteínas de *E. vogeli* são encontradas (data de busca: 11/06/2019). Destas sequências, algumas delas possuem potencial para o diagnóstico de EP, devido à semelhança aos achados de antígenos com potencial diagnóstico para *E. granulosus* e *E. multilocularis* (Siles-Lucas et al., 2017).

Gottstein et al. (1995) utilizaram com sucesso extratos brutos e extratos de uma fração purificada por imunoabsorção da proteína EV2 de *E. vogeli*, tendo sido

testados tanto no imunoblot como no ELISA. De la Rue et al. (2010) compararam a reatividade de soros de pacientes com três tipos de infecções por *Echinococcus* (EC, EP e EA) sob a mesma condição, contra três subunidades AgB, utilizando a técnica de Imunoblot. Os autores confirmaram que o AgB é eficaz para a detecção das infecções do gênero. No entanto, não identificamos nenhum estudo testando proteínas recombinantes para o diagnóstico da EP. Sendo assim, selecionamos dois antígenos recombinantes (AgB8/1 e AgB8/2), previamente padronizados com sucesso para o diagnóstico da EC (Virgínio et al., 2003), a fim de testá-los para padronização de um ELISA que possa ser utilizado no diagnóstico da EP nos laboratórios clínicos.

A escolha pelo AgB neste trabalho se justifica por seu comprovado valor diagnóstico, sendo considerado altamente imunogênico em infecções humanas pelo gênero *Echinococcus* (Esfedan et al., 2018; Savardashtaki et al., 2019). O AgB é uma lipoproteína termoestável oligomérica codificada por cinco genes (AgB1-AgB5), compostos de múltiplos de subunidades de 8-kDa. É secretado principalmente pela camada germinativa do cisto hidático e possui uma grande quantidade de lípidos de origem hospedeira, que representam quase 50% da sua massa. Diversos estudos demonstram que o AgB é altamente gênero-específico e representa uma boa ferramenta para o diagnóstico da equinococose (Brehm & Koziol, 2017; Pagnozzi et al., 2018; Silva et al., 2018).

Em um estudo feito com 6 soros de pacientes com PE, De la Rue et al. (2010) avaliaram a sensibilidade e a especificidade de Imunoblot utilizando fluido hidático bruto de *E. granulosus* retirado de cistos de fígado de ovelhas. Os antígenos avaliados foram três subunidades de AgB, com pesos correspondentes a 8, 16 e 24 kDa. Os autores obtiveram reatividade contra estas subunidades com sensibilidades de 80, 40 e 60%, respectivamente. Considerando os três testes em conjunto, a sensibilidade total foi de 83,3%. Em comparação, nosso estudo teve amostragem de 43 soros diagnosticados com PE, e obtivemos valores de sensibilidade de 83,72 e 81,40% frente aos antígenos recombinantes rAgB8/1 e rAgB8/2, com sensibilidade total atingindo 97,8%.

Estes resultados são bastante satisfatórios, inclusive quando comparamos com outros métodos sorológicos testados em pacientes com EC, espécie da qual

os antígenos recombinantes foram clonados. Segundo Wen et al., (2019), as sensibilidades relatadas para diversos testes e antígenos na literatura variam de 60 a 90% em pacientes com EC e o uso de antígenos recombinantes de AgB e de Ag5 de *E. granulosus* e Ag5 são os que apresentam maiores valores diagnósticos.

A falta de antígenos apropriados com sensibilidade razoável para a detecção sorológica de pequenos cistos no fígado e de cistos de qualquer tamanho nos pulmões geralmente é apontada como motivos para muitos resultados negativos. Estima-se que o encistamento do metacéstóide dificulta ou impede a estimulação de células produtoras de anticorpos e, por consequência, causam ausência de níveis mensuráveis de anticorpos gerados contra antígenos de *Echinococcus* sp (Wen et al., 2019). Nos pacientes avaliados neste estudo, nenhum teve cisto localizado nos pulmões, não sendo possível avaliar diferenças na reatividade através desse parâmetro.

Comparando com os resultados obtidos por Virgínio et al. (2003) para os antígenos recombinantes rAgB8/1 e rAgb8/2 em amostras de EC, obtivemos valores menores de sensibilidade e especificidade em ambos os antígenos. Naquele estudo, foram encontrados valores de sensibilidade e especificidade de 84,5 e 91,2% para o rAgB8/1 e 93,1 e 99,5% para o rAgB8/2. No entanto, diferentemente do nosso trabalho, os autores utilizaram a totalidade de soros com confirmação diagnóstica por análise histológica depois de procedimento cirúrgico, cabendo ainda ressaltar que os antígenos utilizados foram clonados de *E. granulosus* e não de *E. vogeli*.

Em outro estudo avaliando a sensibilidade e especificidade de diversos antígenos recombinantes (incluindo o rAgB8/1 e o rAgB8/2) em EC utilizando soros de pacientes de diversos países sul americanos, Lorenzo et al. (2005) encontraram valores de sensibilidade e especificidade que variaram bastante de acordo com a proveniência do soro, mas com relação aos dois antígenos que testamos, demonstraram resultados relativamente próximos ao que obtivemos, independentemente da localização geográfica.

No presente estudo, a comparação entre os antígenos recombinantes demonstrou que o rAgB8/1 apresentou performance levemente melhor do que o

rAgB8/2 em ELISA anti-IgG. No entanto, através do cálculo do índice crítico z, não encontramos diferenças significativas entre as áreas sob a curva ROC. Este resultado demonstra a possibilidade de que ambos os antígenos apresentam valores diagnósticos similares para a EP, diferentemente do que foi visto em outros estudos avaliando o valor diagnóstico desses antígenos para a EC, que obtiveram melhores resultados com o rAgB8/2 (Gonzalez-Sapienza et al., 1996; Chemale et al., 2001; Virgínio et al., 2003).

Um problema geralmente verificado nos testes sorológicos para a equinococose é a alta porcentagem de resultados falsos positivos. O uso de IgG-ELISA baseado no uso de antígenos do fluido hidático pode gerar resultados falsos positivos em doadores saudáveis provenientes de áreas geográficas diversas (Lorenzo et al., 2005; Siles-Lucas., 2017). A reatividade cruzada de anticorpos contra o fluido hidático já foi encontrada em pacientes com outras doenças parasitárias e não parasitárias, entre elas a cisticercose (Carmena et al., 2006; Manzano-Roman et al., 2015), clonorquíase (Jin et al., 2013), fasciolose e esquistossomose (Tawfeek et al., 2011), ascaridíase, amebíase (Chirag et al., 2015), teníase, paragonimíase, ancilostomíase, gnatostomíase, estrogiloidíase, triquinose, capilaríase e tricuriase (Dekumyoy et al., 2005).

Reações cruzadas com subunidades de 8 kDa de AgB já foram descritas anteriormente, sendo que o AgB8/2 foi classificado como mais específico para *E. granulosus*. Virgínio et al. (2003), no entanto, demonstram especificidade de 94 e 97% em relação a soros de pacientes com sorologia positiva para cisticercose e toxocaríase. Neste estudo, encontramos especificidade de 90,9% para ambos os antígenos recombinantes, em relação a soros positivos para cisticercose, ascaridíase, esquistossomose, estrogiloidíase, ancilostomíase e himenolepiíase. Destes, somente um soro positivo para ascaridíase demonstrou positividade para ambos os antígenos testados. Além disso, demonstramos alta especificidade (83,12 e 80,09% respectivamente) em relação a soros de pacientes saudáveis provenientes de área endêmica.

A precisão do ELISA para ambos os antígenos foi considerada satisfatória, uma vez que o ensaio apresentou variação intra-ensaio entre 3,15 e 13,74% e

inter-ensaio 4,89 e 13,43% para rAgB8/1 e variação intra-ensaio entre 2,44 e 10,25% e inter-ensaio 6,42 e 15,71% para rAgB8/2. Nossos resultados demonstraram reprodutibilidade e precisão, estando de acordos com os critérios de aceitação para a validação de ensaios do FDA, que preconizam que pelo menos 67% das amostras de controle devem estar entre 15% do seu valor nominal, e em certas circunstâncias, critérios de aceitação mais amplos podem ser justificáveis. Este critério é conhecido como regra 4-6-15.

A utilização dos testes com ambos os antígenos em paralelo aumentou consideravelmente a sensibilidade total dos testes. Essa informação é de grande importância para uma possível utilização dos testes em rotina laboratorial. A utilização de uma combinação (mistura) dos antígenos pode representar aumento significativo na sensibilidade do teste, porém pode apresentar eventuais reatividades cruzadas exacerbadas. A padronização de outros antígenos recombinantes também tem potencial para aumentar ainda mais a eficiência do diagnóstico e poderia representar uma ferramenta para a confirmação de amostras de soro fracamente positivas ou negativas classificadas como duvidosas em triagens iniciais, com DOs próximas do valor de *cut-off*, um cenário comum na sorologia da doença (Lorenzo et al., 2005).

Nossos resultados indicam que os antígenos recombinantes rAgB8/1 e rAgB8/2 têm boa performance em ELISA para a detecção de anticorpos específicos em soros de pacientes com EP e podem reduzir os problemas que influenciam negativamente no diagnóstico sorológico das equinococoses. A combinação dos ELISAs frente a ambos os antígenos recombinantes testados pode ser útil para a confirmação do diagnóstico clínico baseado em imagens e apresenta grande potencial para estudos epidemiológicos, nos quais geralmente a praticidade e os baixos custos possuem maior importância do que uma eficiência total.

7. Conclusão

- Este é apenas o segundo estudo na literatura sobre a estrutura e variabilidade genética de populações de *E. vogeli* e, portanto, nossas descobertas serão de interesse para a comunidade que pesquisa sobre doenças tropicais negligenciadas.
- *E. vogeli* sofreu pouca migração no Acre e a presença de haplótipos compartilhados entre diferentes populações parece refletir a retenção de polimorfismos ancestrais.
- Novas estratégias de amostragem ainda são necessárias para fornecer uma imagem melhor da dinâmica populacional de *E. vogeli* na Amazônia.
- Uma melhor compreensão da dinâmica, estrutura e diversidade genética desta espécie deve auxiliar no diagnóstico, epidemiologia e prevenção da EP, além de contribuir para estudos taxonômicos e evolutivos.
- Os antígenos recombinantes rAgB8/1 e rAgB8/2 apresentam bom desempenho em ELISA indireto para a detecção de anticorpos (IgGs totais) em soros de pacientes com EP, sendo um substituto potencial para preparações antigênicas brutas derivadas de fluido hidático ou AgB nativo purificado. A combinação do uso de ambos os antígenos pode ser útil para confirmação do diagnóstico clínico ou para levantamentos epidemiológicos.
- Estes antígenos possuem valor diagnóstico comprovado para outras espécies do gênero *Echinococcus*, no entanto este representa o primeiro estudo que testa a utilização desses antígenos em pacientes com EP.

8. Referências

Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Hidatidosis. 2. ed., Org Pan Salud: Washington, 1989; 734-54.

Almeida FB, Rodrigues-Silva R, Neves RH, Romani ELS, Machado-Silva JR. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* in livestock from Peru. *Vet Parasitol.* 2007 ; 143(1): 50–8.

Almeida, FB. Hidatidose policística no norte do Brasil: abordagem parasitológica e histopatológica de pacas e casos humanos. 2012. 135f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Amagai M, Komai A, Hashimoto T et al. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999; 140:351–7.

Amman RW, Eckert J. Cestodes: *Echinococcus*. *Gastroenterol Clin North Am.* 1996; 25:655-689.

Antoniou M, Tselentis Y. Studies on *Echinococcus granulosus* using the scanning electron microscope. II. The hooks. *Parasitol Res.* 1993; 79: 543-546.

Babba H, Messedi A, Masmoudi S, Zribi M, Grillot R, Ambriose-Thomas P, et al. Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50(1): 64–8.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999; 16(1): 37–48.

Bashiri S, Nemati Mansoor F, Valadkhani Z. Expansion of a highly sensitive and specific ELISA test for diagnosis of hydatidosis using recombinant EgB8/2 protein. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences.* 2019; 22(2): 134–139.

Bittencourt-Oliveira F, Teixeira P, Alencar A, Menezes R, Corrêa C, Neves et al. First parasitological, histopathological and molecular characterization of *Echinococcus vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 from *Cuniculus paca* Linnaeus,

1766 in the Cerrado biome (Mato Grosso do Sul, Brazil). *Vet Parasitol.* 2018; 250: 35–9.

Bourée P. Hydatidosis: dynamics of transmission. *World J Surg.* 2001; 25(1): 4–9.

Bowles J, Blair D, Mcmanus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 54(2): 165–73.

Bowles J, Mcmanus DP. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;57(2):231–9.

Bowles J, Blair D, Mcmanus DP. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology.* 1995;110 (Pt 3):317–28.

Bowman DD, Lynn RC & Eberhard, ML. 2004. *Georgis Parasitologia para Veterinários*, Elsevier. 8th Ed. Madrid. 440pp.

Brehm K, Koziol U. *Echinococcus*–Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Adv Parasitol.* 2017; 95: 147–212.

Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica.* 2010; 114(1):1–16.

Capron A, Biguet J, Vernes A. Immunologic diagnosis of the hepatic or hepato-biliary manifestations of helminthiasis. Apropos of 214 cases. *Rev Med Chir Mal Foie.* 1967; 42(2):81–104.

Carmena D, Martínez J, Benito A, Guisantes JA. Shared and non-shared antigens from three different extracts of the metacestode of *Echinococcus granulosus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(8): 861–7.

Carmena, D, Benito A, Eraso E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: an update. *Acta Trop.* 2006; 98: 74-86.

Chapadeiro E, Lopes ER, de Mesquita PM. On a case of autochthonous human hydatidosis in Minas Gerais. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1964; 6:171-3.

Chemale G, Haag KL, Ferreira HB, Zaha A. *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; 116: 233–7.

Chirag S, Fomda BA, Khan A, Malik AA, Lone GN, Khan BA, et al. Detection of hydatid-specific antibodies in the serum and urine for the diagnosis of cystic echinococcosis in patients from the Kashmir Valley, India. *J. Helminthol*. 2015; 89: 232-37.

Chung JY, Bahk YY, Huh S, Kang SY, Kong Y, Cho SY. A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *J Infect Dis*. 1999; 180(4): 1307–15.

Craig PS, Hegglin D, Lightowers MW, Torgerson PR, Wang Q. Echinococcosis: Control and Prevention. *Adv Parasitol*. 2017; 96: 55–158.

Daeki AO, Craig PS, Shambesh MK. Igg-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000; 94(4): 319–28.

D'Alessandro A, Moraes MA, Raick AN. Polycystic hydatid disease in Brazil. Report of five new human cases and a short review of other published observations. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996; 29: 219-28.

D'Alessandro A. Polycystic echinococcosis in tropical America: *Echinococcus vogeli* and *E. Oligarthus*. *Acta Trop*. 1997; 67:43-65.

D'Alessandro A, Rausch RL. New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthus*) echinococcosis. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21(2): 380–401.

Dantas TVM, Araújo SAC, Pinheiro RR, Aragão MAC, Silva JBA, Ricarte ARF, et al. Desenvolvimento e padronização de um Elisa indireto para diagnóstico de maedi visna em ovinos. *Ci. Anim. Bras*. 2008; 9:181-187.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. Jmodeltest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 2012; 9(8): 772.

De la Rue ML, Yamano K, Almeida CE, Lesbich MP, Fernandes CD, Goto A, et al. Serological reactivity of patients with *Echinococcus* infections (*E. granulosus*, *E. vogeli*, and *E. multilocularis*) against three antigen B subunits. *Parasitol Res.* 2010; 106(3): 741–5.

Dekumyoy P, Riyong D, Pakdee W, Waikagul J. Negative-ELISA using native and filtrated cystic fluid antigens to rule out cystic echinococcosis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2005; 36; 139-45.

Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, Torgerson PR, Harandi MF, Romig T, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis. *Adv Parasitol.* 2017; 95:315-493.

Dixon JB, Jenkins P. Immunology of mammalian metacestode infections. I Antigen, protective immunity and immunopathology *Helminthol. Abs.* 1995; 64: 533-542.

Drummond AJ, Suchard, MA, Xie, D, Rambault, A. Bayesian phylogenetics with beauti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012. 29(8): 1969–73.

Drummond AJ, Bouckaert RR. *Bayesian Evolutionary Analysis with BEAST.* 1 ed. Cambridge University Press. 2015; 260 pp.

Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17:107-135.

Eckert J, Thompson RCA. Historical Aspects of Echinococcosis. *Adv Parasitol.* 2017;95:1–64.

Eisenberg JF, Redford KH. Order Rodentia. In: *Mammals of the neotropics: the northern neotropics Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana.* Chicago: University of Chicago, 1989; 1: 395-7.

Esfedan AF, Sarkari B, Mikaeili F. Genetic Variability of Antigen B8/1 among *Echinococcus granulosus* Isolates from Human, Cattle, and Sheep in Fars Province, Southern Iran. *Rep Biochem Mol Biol.* 2018; 6(2): 164-169.

Espíndola NM. Characterization of *Taenia crassiceps* cysticerci and their application to diagnosis of the human cysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004; 62(2a): 372–372.

Farag H, Bout D, Capron A. Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.). *Biomedicine.* 1975; 23(7): 276–8.

Famarzi T, Mobasheri M, Yoosefy A, Valadkhani Z. Expression and purification of truncated recombinant B8/1 protein of *Echinococcus granulosus* for diagnosis of hydatid infection in human. *Acta Trop.* 2019; 191: 139–45.

Fernández V, Ferreira HB, Fernández C, Zaha A, Nieto A. Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 77(2):247-50.

Ferreira HB, Zaha A. Expression and analysis of the diagnostic value of an *Echinococcus granulosus* antigen gene clone. *Int J Parasitol.* 1994; 24(6): 863–70.

Ferreira HB, Rodrigues JJS, Zaha, A. *Echinococcus granulosus* recombinant antigens. *Ciênc Hoje.* 1996; 48:370–6.

Ferreira MS, Rocha A, Gonçalves EG, Carvalho AM, Nishioka AS, Andrade NB. Um caso de hidatidose policística autóctone de Minas Gerais, Brasil: relato de caso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987; 20:181-6.

Ferreira MS, Nishioka SA, Rocha A, D'Alessandro A. *Echinococcus vogeli* polycystic hydatid disease: report of two Brazilian cases outside the Amazon region. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1995; 89:286-7.

Flores MS, Carrillo P, Tamez E, Rangel R, Rodríguez EG, Maldonado MG, et al. Diagnostic parameters of serological ELISA for invasive amoebiasis, using antigens preserved without enzymatic inhibitors. *Exp Parasitol.* 2016; 161: 48–53.

Fonseca-Jr OG, Costa AP. Hidatidose: comparação sobre 16 (dezesseis) casos para determinação microrregional de focos no Estado do Pará. [Monografia] – Departamento de Ciências da Saúde. Faculdade de Medicina, UFPA, Pará; 1995.

Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997; 147(2): 915–25.

Gazzinelli A, Correa-Oliveira R, Yang GJ, Boatin BA, Kloos H. A research agenda for helminth diseases of humans: social ecology, environmental determinants, and health systems. *Plos Negl Trop Dis*. 2012; 6(4): e1603.

Genzini T, Siqueira NG, Noujaim HM, Santos RG, Yamashita ET, Trevizol AP, et al. Liver transplantation for neotropical polycystic echinococcosis caused by *Echinococcus vogeli*: a case report. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2013; 46(1): 119–20.

Gifre L, Arís A, Bach À, Garcia-Fruitós E. Trends in recombinant protein use in animal production. *Microbial Cell Factories*. 2017; 4;16(1):40.

Giri S, Parija S. A review on diagnostic and preventive aspects of cystic echinococcosis and human cysticercosis. *Trop Parasitol*. 2012; 2(2): 99-108.

González-Sapienza G, Nieto A, Fernández C, Orn A, Wernstedt C, Hellman U. Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol*. 1996; 18: 587– 96.

Gottstein B, D'Alessandro A, Rausch RL. Immunodiagnosis of polycystic hydatid disease/polycystic echinococcosis due to *Echinococcus vogeli*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53(5): 558–63.

Greene RM, Hancock K, Wilkins PP, Tsang V. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14 and 18 kDa related, diagnostic antigens. *J Parasitol*. 2000; 86(5): 1001-1007.

Grubor NM, Jovanova-Nesic KD, Shoenfeld Y. Liver cystic echinococcosis and human host immune and autoimmune follow-up: A review. *World J Hepatol*. 2017; 28;9(30): 1176–89.

Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982; 143:29–36.

Hernandez-Gonzalez A, Santivanez S, García HH, Rodríguez S, Muñoz S, Ramos G, et al. Improved serodiagnosis of cystic echinococcosis using the new recombinant 2B2t antigen. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2012; 6: 1714.

Hemphill A, spicher M, Stadelmann B, Mueller J, Naguleswaran A , Gottstein B, et al. Innovative chemotherapeutical treatment options for alveolar and cystic echinococcosis. *Parasitology*. 2007; 134: 1657–1670.

Hobbs RP, Lymbery AJ, Thompson RC. Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian hosts, and its implications for strain recognition. *Parasitology*. 1990 ; 101 (Pt 2): 273–81.

Jazouli M, Lightowlers M, Gauci CG, Tadlaoui K, Belmlih A, Ennaji MM, et al. Vaccination Against Hydatidosis: Molecular Cloning and Optimal Expression of the EG95NC– Recombinant Antigen in *Escherichia coli*. *Protein J*. 2017; 36(6): 472–7.

Jin Y, Anvarov K, Khajibaev A, Hong S, Hong ST. Serodiagnosis of echinococcosis by ELISA using cystic fluid from Uzbekistan sheep. *Korean J. Parasitol*. 2013; 51: 313-17.

Johnstone A, Thorpe R. Basic techniques. *Immunochemistry in practice*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982:1–17.

Kachani M, Heat D. Dog population management for the control of human echinococcosis. *Acta Trop*. 2014; 139c: 99-108.

Kern P, Silva AM, Akhan O, Müllhaupt B, Vizcaychipi KA, Budke C, et al. The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease. *Adv Parasitol*. 2017; 96:259-369.

Kilimcioğlu AA, Girginkardeşler N, Korkmaz M, Özkol M, Düzgün F, Östan I, et al. A mass screening survey of cystic echinococcosis by ultrasonography, Western blotting, and ELISA among university students in Manisa, Turkey. *Acta Trop*. 2013; 128, 578-83.

Knapp J, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Saarma U, Lavikainen A, et al. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): An inference from nuclear protein-coding genes. *Mol Phylogenet Evol*. 2011;61(3):628–38.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6): 1547–9.

Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Diaz ML, Govezensky T, Coltorti E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 40(3): 282–90.

Larrieu E, Uchiumi L, Salvitti JC, Sobrino M, Panomarenko O, Tissot H, et al. Epidemiology, diagnosis, treatment and follow-up of cystic echinococcosis in asymptomatic carriers. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019;13(2):4–80.

Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology.* 2003;127(Pt 3): 207–15.

Leggatt GR, Yang W, Mcmanus DP. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992; 86(2): 189–92.

Lewall D, Mccorkell S. Rupture of echinococcal cysts: diagnosis, classification, and clinical implications. *Am J Roentgenol.* 1986 ;146(2):391–4.

Li J, Zhang W-B, Loukas A, Lin R-Y, Ito A, Zhang L-H, et al. Functional expression and characterization of *Echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage. *Gene.* 2004; 326: 157–65.

Li T, Chen X, Zhen R, Qiu J, Qiu D, Xiao N, et al. Widespread co-endemicity of human cystic and alveolar echinococcosis on the eastern Tibetan Plateau, northwest Sichuan/southeast Qinghai, China. *Acta Trop.* 2010; 113(3): 248–56.

Liance M, Janin V, Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Houin R, Piarroux R. Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: confirmatory testing and species differentiation by new commercial Western blot. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3718–21.

Librado P, Rozas J. Dnasp v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009; 25(11): 1451–2.

Lightowlers MW. Immunology and molecular biology of *Echinococcus* infections. *Int J Parasitol*. 1990; 20(4): 471–8.

Lorenzo C, Ferreira HB, Monteiro KM, Rosenzvit M, Kamenetzky L, García HH, et al. Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43: 2764-70.

Lymbery AJ, Thompson RC. Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. *Int J Parasitol*. 1988; 18(6) :803-11.

Lymbery AJ. Phylogenetic pattern, evolutionary processes and species delimitation in the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol*. 2017; 95: 111-145.

Machado AV, Rangel NM. Notas estatísticas de anatomia patológica veterinária em Minas Gerais, Brasil. *Arq Esc Vet UREMG*. 1964; 16:375-417.

Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, Fried JA, Wilson M, Tsang VC. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 40(4): 377–83.

Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakaya K, Nakao M, Lightowlers MW, et al. Usefulness of hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic Echinococcosis in humans. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9(3): 573–6.

Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, et al. Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(3): 1082–8.

Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Ishikawa Y, et al. Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitol Int*. 2006; 55 Suppl:S57-62.

Manzano-Roman R, Sanchez-Ovejero C, Hernandez-Gonzalez A, Casulli A, Siles-Lucas M, 2015. Serological diagnosis and follow-up of human cystic echinococcosis: a New Hope for the future? Biomed. Res. Int. 2015; 428205.

Marty AM, Andersen EM. Helminthology. In: Doerr W, Seifert G (ed.). Tropical Pathology, Springer: Berlin, 844-864, 1995.

Mayor P, Baquedano LE, Sanchez E, Aramburu J, Gomez-Puerta LA, Mamani VJ, et al. Polycystic echinococcosis in Pacas, Amazon region, Peru. Emerging Infect Dis. 2015; 21(3): 456–9.

McManus DP. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002; 96 Suppl 1: S151-7.

McManus DP, Bowles J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. Int J Parasitol. 1996; 26(7): 687–704.

Meneghelli UG, Barbó MLP, Magro JE, Bellucci AD, Velludo MASL. Polycystic Hydatid Disease (*Echinococcus vogeli*): Clinical and Radiological Manifestations and Treatment with Albendazole of a Patient from the Brazilian Amazon Region. Arq Gastroenterol. 1986; 23: 177-83.

Meneghelli UG, Martinelli ALC, Velludo, MASL. *Echinococcus vogeli* cysts in paca liver (*Cuniculus paca*) native from the Acre State, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 1990. 23: 153-155.

Meneghelli UG, Martinelli ALC, Velludo MASL, Bellucci AD, Magro JE, Barbo MLP. Polycystic hydatid disease (*Echinococcus vogeli*) clinical, laboratory and morphological findings in nine Brazilian patients. J Hepatol. 1992; 14: 203-210.

Meneghelli UG, Martinelli ALC, Villanova MG, Martinez R, Velludo MASL, Afonso MGP, et al. Identificação de área de elevada ocorrência da doença hepática policística no Brasil: Estado do Acre. In: An XXXV Cong Bras Gastroenterol, XI Cong Bras de Endosc Digest, VIII Cong Nac Col Bras Cir Digest, Salvador – Bahia, CD-Rom, 1998.

Miles S, Portela M, Cyrklaff M, Ancarola ME, Frischknecht F, Durán R, et al. Combining proteomics and bioinformatics to explore novel tegumental antigens as vaccine candidates against *Echinococcus granulosus* infection. *J Cell Biochem.* 2019; 120: 15320-15336.

Mohammadzadeh T, Sako Y, Sadjjadi SM, Sarkari B, Ito A. Comparison of the usefulness of hydatid cyst fluid, native antigen B and recombinant antigen B8/1 for serological diagnosis of cystic echinococcosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(6): 371–5.

Moks E, Jõgisalu I, Valdmann H, Saarma U. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology.* 2008;135(5):647–54.

Moraes MAP, Arnaud MVC. Hidatidose - Equinococose neotropical. In Leão RN, Bichara CN, Miranda ECB, et al (eds). *Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque Amazônico. 1ª Edição.* Belém. CEJUP: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997, pp. 717-721.

Mubanga C, Mwape KE, Phiri IK, Trevisan C, Zulu G, Chabala C, et al. Progress on the development of rapid diagnostic tests for foodborne neglected zoonotic helminthiasis: A systematic review. *Acta Trop.* 2019; 194: 135–47.

Nakao M, Lavikainen A, Iwaki T, Haukisalme V, Konyaev S, Oku Y, et al. Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): Proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck, 1816 and the creation of a new genus *Versteria*. *Int J Parasitol.* 2013;43(6):427–37.

Nakao M, Li T, Han X, Ma X, Xiao N, Qiu J, et al. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Int J Parasitol.* 2010; 40(3): 379–85.

Nakao M; Mcmanus DP; Schantz PM; Craig PS; Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology.* 2007; 134(Pt 5): 713-722.

Njeruh FM, Gathuma JM, Tumboh-Oeri AG. Diagnosis of human hydatidosis in Kenya. II. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on a thermo-stable antigen. *East Afr Med J.* 1986; 63(5): 318–21.

Novo Alonso C, Ferreira JG, Fernández AR, Antequera EH, Blanco JAZ, Gajate GV. Hepatic alveolar hydatidosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 1993; 84(2): 127–9.

Obregón-Henao A, Gil DL, Gómez DI, Sanzón F, Teale JM, Restrepo BI. The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kd. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 114(2): 209–15.

Oriol R, Williams JF, Pérez Esandi MV, Oriol C. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am J Trop Med Hyg.* 1971; 20(4): 569–74.

Pagnozzi D, Tamarozzi F, Roggio AM, Tedde V, Addis MF, Pisanu S, et al. Structural and immunodiagnostic characterization of synthetic Antigen B subunits from *Echinococcus granulosus* and their evaluation as target antigens for cyst viability assessment. *Clin Infec Dis.* 2018; 17; 66(9): 1342–51.

Paramasvaran S, Sani RA, Hassan L, Hanjeet K, Krishnasamy M, Johm J, et al. Endo-parasite fauna of rodents caught in five wet markets in Kuala Lumpur and its potential zoonotic implications. *Trop Biomed.* 2009; 26: 67-72, 2009.

Pastore R. Estudo da infecção pelo *Echinococcus* sp. na área do município de Sena Madureira – Acre. Dissertação de Mestrado, UNB, Brasília, 161p. 2001.

Pastore R, Vitali LH, Macedo VO, Prata A. Inquérito sorológico da infecção pelo *Echinococcus* sp no município de Sena Madureira, AC. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36:473-7.

Peralta RHS, Vaz AJ, Pardini A, Macedo HW, Machado LR, De Simone SG, et al. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop.* 2002; 83(2): 159–68.

Pinel C, Fricker H, Chumpitazi B, Grillot R. Ambroise-thomas P. The immunodiagnostic value of six serological techniques in hydatidosis. *Serodiag Immun in Inf D.* 1989; 3: 231-240.

Rahimi H, Sadjjadi S, Sarkari B. Performance of antigen B isolated from different hosts and cyst locations in diagnosis of cystic echinococcosis. Iran. J. Parasitol. 2011; 6: 12-19.

Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ (2014) Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Rausch RL, Bernstein JJ. *Echinococcus vogeli* sp. N. (Cestoda: Taeniidae) from the Bush Dog, *Speothos venaticus* (Lund). Z Prakt Anst Wiederbeleb Intensivther. 1972; 23(1): 25-34.

Rausch RL, D'alessandro A. Histogenesis in the metacestode of *Echinococcus vogeli* and mechanism of pathogenesis in polycystic hydatid disease. J Parasitol. 1999; 85: 410-418.

Restrepo BI, Obregón-Henao A, Mesa M, Gil DL, Ortiz BL, Mejía JS, et al. Characterisation of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. Int J Parasitol. 2000; 30(6): 689–96.

Rickard MD. Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease. I. Latex agglutination and immunoelectrophoresis using crude cyst fluid antigen. Pathology. 1984; 16(2): 207–1.

Rickard MD, Lightowers MW 1986. Immunodiagnosis of hydatid disease. In RCA Thompson, *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*, George Allen & Unwin, London (1986), p. 217-249.

Riganò R, Profumo E, Siracusano A. New perspectives in the immunology of *Echinococcus granulosus* infection. Parassitologia. 1997; 39(4): 275–7.

Riganò R, Profumo E, Loppolo S, Notargiacomo S, Teggi A, Siracusano A. Cytokine patterns in seropositive and seronegative patients with *Echinococcus granulosus* infection. Immunol Lett. 1998; 64(1): 5–8.

Robles Y, González E, Govezensky T, Mungia ME, Acero G, Bobes RJ, et al. Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation of their use for diagnosis of neurocysticercosis. Clin Immunol. 2005; 116(3): 265–70.

Rodrigues-Silva R, Peixoto JRV, de Oliveira RMF, Magalhães-Pinto R, Gomes DC. An autochthonous case of *Echinococcus vogeli* Rausch & Bernstein,

1972 polycystic echinococcosis in the state of Rondônia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(1):123–6.

Rodrigues-Silva R, Almeida FB, Machado-Silva JR. Hidatidose humana no Brasil. Manual de Procedimentos técnicos para o diagnóstico parasitológico e imunológico. Ministério da Saúde 2011; 68p.

Rogan MT, Craig PS. Immunology of *Echinococcus granulosus* infections. Acta Trop. 1997; 67(1–2): 7–17.

Romig T, Deplazes P, Jenkins D, Giraudoux P, Massolo A, Craig PS, et al. Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. Adv Parasitol. 2017;95:213–314.

Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol. 2014; 5 (172): 1-17.

Rott MB, Fernández V, Farias S, Ceni J, Ferreira HB, Haag KL, et al. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. Acta Trop. 2000; 75(3): 331–40.

Sadjjadi SM, Abidi H, Sarkari B, Izadpanah A, Kazemian S. Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay, utilizing native antigen B for serodiagnosis of human hydatidosis. Iran J Immunol. 2007; 4(3): 167–72.

Sako Y, Nakao M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, Ito A. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. J Clin Microbiol. 2000; 38(12): 4439–44.

Sánchez E, Cáceres O, Náquira C, Garcia D, Patiño G, Silvia H, et al. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(6): 806–10.

Sánchez E, Cáceres O, Náquira C, Miranda E, Samudio F, Fernandes O. *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from an endemic region in Peru. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107(2): 275–8.

Santos GB, Soares M do CP, Brito EMF, Rodrigues AL, Siqueira NG, Gomes-Gouvêa MS, et al. Mitochondrial and nuclear sequence polymorphisms reveal geographic structuring in Amazonian populations of *Echinococcus vogeli* (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol.* 2012; 42(13–14): 1115–8.

Sarkari B, Rezaei Z. Immunodiagnosis of human hydatid disease: where do we stand? *World J. Methodol.* 2015; 5: 185-95.

Savardashtaki A, Mostafavi-Pour Z, Arianfar F, Sarkari B. Comparison of the Utility of Recombinant B8/2 Subunit of the Antigen B, Native Antigen, and a Commercial ELISA Kit in the Diagnosis of Human Cystic Echinococcosis. *Iran Biomed J.* 2019; 23(4):246-52.

Savardashtaki A, Sarkari B, Arianfar F, Mostafavi Z. Immunodiagnostic Value of *Echinococcus granulosus* Recombinant B8/1 Subunit of Antigen B. *Iran J Immunol.* 2017; 14(2): 111-22.

Schantz PM. Echinococcosis/hydatidosis (Hydatid disease). In: *Tropical Medicine and Parasitology.* East Norwalk: Goldsmith, R. & Heyneman, D. Appleton & Lange; 1989. P. 503–11.

Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, Mcmanus DP. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology.* 1997;114 (Pt 1):37–43.

Shapiro SZ, Bahr GM, Hira PR. Analysis of host components in hydatid cyst fluid and immunoblot diagnosis of human *Echinococcus granulosus* infection. *Ann Trop Med Parasitol.* 1992 ; 86(5): 503–9.

Sharma M, Fomda BA, Mazta S, Sehgal R, Singh B, Malla N. Genetic diversity and population genetic structure analysis of *Echinococcus granulosus* sensu stricto complex based on mitochondrial DNA signature. *Plos ONE.* 2013; 8(12): e82904.

Siles-Lucas M, Casulli A, Conraths FJ, Müller N. Laboratory diagnosis of *Echinococcus* spp. In human patients and infected animals. *Adv Parasitol.* 2017; 96: 159-257.

Silva CAM, Soares MCP, Alves MM, Conde SRS, Amaral IA, Teixeira LSC. Hidatidose/Equinococose na Amazônia Oriental Brasileira – Atualização da Casuística. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35:243.

Silva ED, Cancela M, Monteiro KM, Ferreira HB, Zaha A. Antigen B from *Echinococcus granulosus* enters mammalian cells by endocytic pathways. PLOS Neglect Trop D. 2018; 12(5): e0006473.

Siqueira NG. Hidatidose policística no Estado do Acre: contribuição para o diagnóstico, tratamento e prognóstico dos pacientes [tese]. Acre: Universidade Federal do Pará; 2010.

Siqueira NG, Almeida FB, Chalub SR, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R. Successful outcome of hepatic polycystic echinococcosis managed with surgery and chemotherapy. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 2007; 101:624-6.

Siqueira NG, Almeida FB, Suzuki YAC, Lima RNA, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R. Atypical polycystic echinococcosis without liver involvement in Brazilian patients. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 2010; 101:230-3.

Siqueira NG, Santos-Jesus R, Tanajura D, Tavares-Neto J. Doença hidática policística: análise secundária de dados. Rev Col Bras Cir. 2003; 30(3): 205–15.

Siqueira NG, Siqueira CM, Rodrigues-Silva R, Soares MC, Póvoa MM. Polycystic echinococcosis in the state of Acre, Brazil: contribution to patient diagnosis, treatment and prognosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(5): 533–540.

Siqueira NG, Tanajura D, Tavares-Neto J. Equinococose - Relato de Caso. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2002; 35(supl.): 236.

Smith DB, Johnson KS. Single-step purification polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene 1988; 67:31–40.

Soares MCP, Fonseca-Jr OG, Alves MM, Cartágenes PRB, Amaral IA, Freitas AF, et al. Equinococose na Amazônia oriental brasileira. Atualização da casuística incluindo casos com revisão etiológica. Rev Para Med. 1999; 14:45

Soares MC, Moreira-silva CA, Alves MM, Nunes HM, Amaral IA, Moia LJMP, et al. Equinococose policística na Amazônia oriental brasileira: atualização da casuística. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37: 75–83.

Sreevatsava V, De S, Bandyopadhyay S, Chaudhury P, Bera AK, Muthiyar R, et al. Variability of the EG95 antigen-coding gene of *Echinococcus granulosus* in animal and human origin: implications for vaccine development. *J Genet.* 2019; 98(53): 1-13 .

Stutzer C, Richards SA, Ferreira M, Baron S, Maritz-Olivier C. Metazoan Parasite Vaccines: Present Status and Future Prospects. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8(67): 1-27.

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989; 123(3): 585–95.

Tamarozzi F, Sako Y, Ito A, Piccoli L, Grisolia A, Itoh S, et al. Recombinant AgB8/1 ELISA test vs. commercially available IgG ELISA test in the diagnosis of cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* 2013; 35:433-40.

Tawfeek GM, Elwakil HS, El-Hoseiny L, Thabet HS, Sarhan RM, Awad NS, et al. Comparative analysis of the diagnostic performance of crude sheep hydatid cyst fluid, purified antigen B and its subunit (12 Kda), assessed by ELISA, in the diagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitol. Res.* 2011; 108: 371-6.

Thompson RCA. Biology and systematics of *Echinococcus*. *Adv Parasitol.* 2017; 95: 65-109.

Thompson RCA, Lymbery AJ, organizadores. *Echinococcus* and hydatid disease. Wallingford, Oxon, UK: CAB International; 1995. 477 p.

Timmerman A, Andrade DR, Hutzler RU, Marinho IS, Uliana SRB. Terapêutica da hidatidose hepática com albendazol: relato de 1 caso. In Abstracts of the IX Congresso Brasileiro de Hepatologia, São Paulo 1986; 85.

Tracy JM, Webster-JR LT. Fármacos usados na quimioterapia das helmintíases. In: Godman&Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Hardman JG, Limbird LE (eds.),mcgraw-Hill, 2006. P 841-855.

USDHHS, FDA, CDER, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2001. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.

Ustünsöz B, Akhan O, Kamiloglu MA, Somuncu I, Ugurel MS, Cetiner S. Percutaneous treatment of hydatid cysts of the liver: long-term results. *Am J Roentgenol*. 1999; 172(1): 91-6.

Vaz AJ, Livramento JA. Neurocisticercose. In: Ferreira, A.W. & Avila, S.L.M. *Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. Cap. 31, p. 316-322.

Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, et al. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol*. 2003;132(2):309–15.

Wakelin D. Immune response to *Echinococcus* infection: parasite avoidance and host protection. *Parassitologia*. 1997; 39(4): 355–8.

Wang JY, Gao CH, Steverding D, Wang X, Shi F, Yang YT. Differential diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis using an immunochromatographic test based on the detection of specific antibodies. *Parasitol. Res*. 2013; 112: 3627-33.

Wang N, Zhu H, Zhan J, Guo C, Shen N, Gu X, et al. Cloning, expression, characterization, and immunological properties of citrate synthase from *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res*. 2019; 118(6): 1811–20.

Wattal C. Evaluation of human cellular immune function in echinococcosis. *Indian J Med Res*. 1990; 91: 214–7.

Wen H, Vuitton L, Tuxun T, Li J, Vuitton DA, Zhang W, Mcmanus DP. Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 32(2): 1-39.

Wilson M, Schantz P, Nutman T. 2006. Molecular and Immunological Approaches to the Diagnosis of Parasitic Infections, p 557-568. *In* Detrick B,

Hamilton R, Folds J (ed), *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition*. ASM Press, Washington, DC.

Zarlenga DS, Rhoads ML, al-Yaman FM. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 67(2): 215–23.

Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(1): 18–36.

Zhang W, McManus DP. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; 47(1): 24–41.

Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:101895.

Zhao X, Zhang F, Li Z, Wang H, An M, Li Y, et al. Bioinformatics analysis of EgA31 and EgG1Y162 proteins for designing a multi-epitope vaccine against *Echinococcus granulosus*. *Infect Genet Evol*. 2019 ;73:98–108.

9. Anexos

Anexo I

Características dos pacientes do Estado do Acre, Brasil, que tiveram cistos de *E. vogeli* excisados cirurgicamente. F - Feminino; M - Masculino.

Nº da amostra	Sexo	Idade (data da cirurgia)	Órgão afetado	Proveniência
1	F	29	Fígado	Sena Madureira
2	F	34	Fígado	Capixaba
3	F	54	Fígado	Rio Branco
4	M	51	Fígado	Rio Branco
5	F	53	Fígado	Cruzeiro do Sul
6	M	43	Fígado	Sena Madureira
7	F	33	Fígado	Rio Branco
8	F	31	Fígado	Sena Madureira
9	M	40	Fígado	Feijó
10	F	ND	Fígado	Manuel Urbano
11	M	44	Fígado	Xapuri
12	M	41	Fígado	Feijó
13	M	38	Fígado	Feijó
14	M	54	Fígado	Sena Madureira
15	F	47	Fígado	Xapuri
16	F	67	Fígado	Feijó
17	F	58	Fígado	Rio Branco
18	F	57	Fígado	Rio Branco
19	F	63	Fígado	Cruzeiro do Sul
20	F	73	Mesentério	Sena Madureira
21	F	67	Mesentério	Feijó
22	F	73	Fígado	Rio Branco
23	F	40	Mesentério	Rio Branco
24	F	27	Fígado	Bujari
25	F	53	Fígado	Feijó
26	F	67	Fígado	Rio Branco
27	M	53	Fígado e Mesentério	Rio Branco
28	M	55	Mesentério	Xapuri

29	M	63	Fígado	Xapuri
30	F	42	Fígado	Feijó
31	F	59	Fígado	Rio Branco
32	F	27	Fígado	Sena Madureira

Anexo II – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Caracterização molecular de isolados de *Echinococcus vogeli* e padronização de método imunodiagnóstico para a equinococose policística baseado em antígenos recombinantes” sob responsabilidade da pesquisadora Rosângela Rodrigues e Silva do Serviço de Referência Nacional em Hidatidose do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ (SRNH-IOC/Fiocruz).

Este estudo destina-se a melhorar o diagnóstico da doença Hidatidose ou Equinococose policística, também conhecida como “Doença da paca”. Essa doença é causada por um verme que se aloja principalmente no fígado, provocando cistos de vários tamanhos e números, simulando neoplasias (câncer). A infecção é adquirida provavelmente através do contato com as fezes de cães que por sua vez se infectam após comerem fígados (ou vísceras) de pacas doentes. O diagnóstico humano na maioria das vezes só pode ser realizado após o fígado estar muito comprometido, resultando em “caroços na barriga”.

Caso você aceite participar dessa pesquisa, receberá este documento TCLE, as explicações sobre a pesquisa e será submetido ao procedimento de coleta de sangue a ser realizado por um profissional habilitado da equipe. Um volume de 15 mililitros de sangue será obtido por punção da veia do antebraço. Você também será entrevistado, mediante a um questionário epidemiológico para equinococose policística, para o fornecimento de informações sobre hábitos e costumes, seu conhecimento sobre a doença, seu estado de saúde geral, além de dados para o seu cadastro. Você poderá ser solicitado para uma nova coleta voluntária de material em algum momento da pesquisa.

Os possíveis riscos ou desconfortos relacionados à coleta de sangue, se ocorrerem, serão os relacionados ao local da punção, como hematoma (rouxidão no local), o qual pode levar até 5 dias para desaparecer.

Se você for menor de dezoito anos, poderá consentir em participar da pesquisa, mas seu(s) responsável(is) legais deverá(ão) autorizar sua participação.

Você poderá saber mais sobre sob qualquer aspecto da pesquisa quando desejar, sendo livre para recusar sua participação, retirar seu consentimento e interromper sua participação a qualquer momento. A sua recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios, além de também não acarretar em custos para você.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar sua identidade com os padrões profissionais de sigilo e os resultados pertinentes ao seu material serão armazenados no laboratório e enviados para você com confidencialidade. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa ser resultado desse estudo e o seu nome ou material não será divulgado ou liberado sem a sua prévia permissão. Uma via deste consentimento será arquivada no SRNH-IOC/Fiocruz e outra via ficará com você.

O sangue e/ou soro serão armazenados primeiramente sob a conduta de Biorrepositório (depósito que se destina ao armazenamento do material pelo tempo de realização da pesquisa), cuja guarda ficará com a pesquisadora Dra Rosângela Rodrigues e Silva, na responsabilidade institucional do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Caso haja necessidade, o tempo de armazenamento poderá ser prolongado mediante justificativa e aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) e o seu material poderá ser futuramente transferido para Biobanco institucional podendo assim ser utilizado em outras pesquisas. Um sistema seguro de identificação será mantido, garantindo sigilo e respeito à confidencialidade e à recuperação dos meus dados, seja para fornecimento de

informações futuras de seu interesse ou para a obtenção de novo consentimento específico para utilização em outra pesquisa.

Você poderá escolher entre as opções abaixo condizentes com a participação nesse estudo:

() Necessito assinar um novo consentimento a cada pesquisa (a cada nova pesquisa o pesquisador responsável entrará em contato para adquirir novo termo de consentimento livre e esclarecido);

() Dispensio a necessidade de assinar novo consentimento a cada pesquisa (seu material biológico poderá ser utilizado para pesquisa futuras sem a necessidade de novo termo de consentimento livre e esclarecido).

Caso seja necessário, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa para esclarecimentos ou informações quanto a eticidade desta pesquisa: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP Fiocruz/IOC - Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz - Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) - Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360 - Telefone: (21) 3882-9011 - Tel/Fax: (21) 2561-4815 – e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br - Skype: cep_fiocruz_ioc.

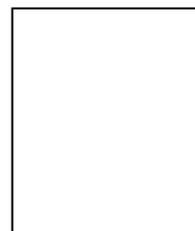
DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE (A) OU DO SEU RESPONSÁVEL:

Eu, _____
_____, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e reavaliar a minha decisão de continuar participando se assim o desejar. Estou satisfeito(a) com as explicações e concordo em ceder meus dados e material biológico (sangue e/ou soro) para esta pesquisa. Fui alertado(a) de que todos os dados desta pesquisa serão

confidenciais. Em caso de dúvidas poderei entrar em contato com a pesquisadora Rosângela Rodrigues e Silva nos telefones (21) 99626-3215 / (21) 2562-1505 / (21) 2562-1485 e pelo e-mail: rsilva@ioc.fiocruz.br. Declaro, assinando abaixo (ou colocando a minha digital) que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e que me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

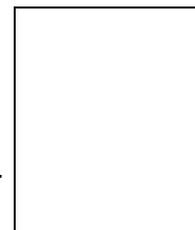
Nome (Assinatura do participante ou digital)

Data: ___ / ___ / ___.



Nome (Assinatura do responsável ou digital, no caso de participante menor 18 anos)

Data: ___ / ___ / ___.

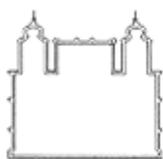


Nome (Assinatura do pesquisador)

Data: ___ / ___ / ___.

Obs: documento em 02 (duas) vias para uma ser entregue ao participante voluntário.

Anexo III – Ficha epidemiológica



Serviço de
Referência Nacional
em Hidatidose
SRNH-LHPV-IOC-Fiocruz

Ficha Epidemiológica para Equinococose Policística

DADOS CADASTRAIS

Número do participante: _____

Nome: _____ Sexo: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Município onde nasceu: _____ UF: _____

Filiação: _____

Profissão ou atividade principal: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Município: _____ UF: _____

Zona: () Urbana () Rural

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Possui cães: () sim () não Quantos: _____

Pratica caça: () sim () não

Quais animais são caçados: _____

Qual o destino dado às vísceras da caça: () dá crua para os cães () cozinha para os cães
() enterra () alimento para suínos () outro:

Conhece a doença chamada Hidatidose? () sim () não. O que você sabe sobre a Hidatidose? _____

Conhece a doença da paca? () sim () não. O que você sabe sobre a doença da paca? _____

DADOS CLÍNICOS E SINTOMAS

Já fez exame antes para equinococose (doença da paca)? () sim () não. Qual? _____

Já tomou remédio antes para equinococose (doença da paca)? () sim () não

Já fez cirurgia (operação) antes para equinococose (doença da paca)? () sim () não

Têm sentido algo? _____

Já teve outros vermes? () sim () não.

Lembra o nome do verme que você já teve? _____

Observações relevantes: _____

Têm caso de equinococose (doença da paca) na família: () sim () não

Quem na família? _____

Qual a idade? _____

Como a pessoa descobriu? _____

Foi tratado? () sim () não. Como? _____

Outras pessoas que moram na mesma residência:

Nº do participante	Nome	Sexo	Data de Nascimento	Ocupação

Observações: