

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ELIZABETH LUZ SÁNCHEZ ROMANÍ

ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE *Echinococcus granulosus*
ISOLADOS DE HOSPEDEIROS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DO PERU

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Octavio Fernandes da Silva Filho

RIO DE JANEIRO
2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R758

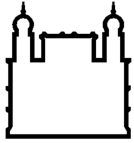
Romani, Elizabeth Luz Sánchez.

Análise molecular e filogenética de *Echinococcus granulosus* isolados de hospedeiros das áreas endêmicas do Peru. / Elizabeth Luz Sánchez Romani. – Rio de Janeiro, 2011.
xvii, 98 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2011.
Bibliografia: f. 85-96

1. Genótipos. 2. *Echinococcus granulosus*. 3. Genes mitocondriais.
4. Genotipificação. 5. Peru. I. Título.

CDD 572.860985



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ELIZABETH LUZ SÁNCHEZ ROMANÍ

ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE *Echinococcus granulosus*
ISOLADOS DE HOSPEDEIROS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DO PERU

ORIENTADOR: Prof. Dr. Octavio Fernandes da Silva Filho

Aprovada em: 29/09/2011

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Junior (Presidente) - IOC

Prof. Dra. Delir Correa Gomes Maués da Serra Freire - IOC

Prof. Dr. José Mauro Peralta - UFRJ

Prof. Dra. Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto (Suplente) - IOC

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello (Suplente) - UERJ

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2011

Aqueles que me deu a vida

María Salomé

e

César (in memoriam)

*Ao Porfito, os meus irmãos
sobrinhos e cunhados*

Com muito amor

AGRADECIMENTOS

Estes últimos quase quatro anos têm sido muito importantes na minha experiência científica e profissional, pois tive o privilégio de me relacionar com pessoas extraordinárias que permitiram que eu pudesse realizar este trabalho até ao final. A todas elas o meu sincero agradecimento:

Ao meu orientador, Dr. Octavio Fernandes, pelo constante apoio, pela confiança depositada em mim e pelo seu exemplo de vida como pesquisador.

Ao Dr. Adeilton Brandão, pelos ensinamentos, assistência técnica, sugestões acertadas e sua disponibilidade sempre que necessitei.

Ao M. Sc. Omar Cáceres, pelas sugestões e discussões ao longo da realização deste trabalho e por ser sempre meu amigo.

Ao Dr. César Náquira, Omar Cáceres, David Garcia, Gladys Patiño, Silvia Herrera pela sua participação na realização deste trabalho,

Ao pessoal dos Laboratórios de Referencia Regional de Puno, Junín, Cusco, Arequipa, Huancavelica e Ayacucho, pela ajuda no momento da coleta das amostras.

À Dra. Aline C. Volotão, pelos ensinamentos e sua ajuda no início da parte experimental do trabalho.

Ao M. Sc. Franklyn Samudio, por compartilhar seus conhecimentos comigo, pelos seus valiosos conselhos e discussões, sobre tudo pela sua amizade e apoio que me deu sempre que foi necessário.

À M. Sc. Nédia Saad Nehme, por facilitar-me sempre os reagentes de laboratório e pela sua amizade.

Ao Dr. William Provance, pelas suas valiosas sugestões e ajuda na correção do inglês do artigo publicado e dos manuscritos relacionados com este trabalho.

À Dra. Martha Mutis, por estar sempre de meu lado toda vez que precisei da sua ajuda e pela sua amizade.

Ao Dr. Arnaldo Maldonado Junior por ser meu amigo e confiar em mim para participar do seu trabalho e do artigo científico, Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brasil, 2011, publicado na revista *Emerging Infectious Diseases* 17 (7): 1331-1333

Aos todos os meus queridos amigos do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas: Tainah, Mariângela, Dário, Nathália P, Nathalia M, Ingrid, Carla, Cátia, Simone S, Simone K, María, Juliana, Grazielle, Renata, Tarsis, Daniel, Elisabete, Josué, pelos inúmeros auxílios e pelo acolhimento que demonstraram fazendo-me sentir em casa.

À Heloisa Nogueira, pelo apoio no desenho das figuras apresentadas no artigo publicado e nos manuscritos.

À M. Sc. Aline Moreira, responsável técnica pela Plataforma de Genômica e Sequenciamento de DNA – PDTIS/FIOCRUZ, pelo apoio no sequenciamento das amostras.

Aos meus colegas e companheiros de trabalho do INS e do Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria do INS, Peru, pelo constante apoio.

Aos Chefes, Dra. Patricia García e Dr. César Cabezas, os Diretores Dr. Pedro Valencia e Manuel Céspedes, do Instituto Nacional de Salud de Lima Peru, pela confiança depositada em mim para a realização do trabalho.

Ao Comitê de Capacitação do INS, Dr. Luis Santamaria, Dr. Victor Suarez, Lic. Teresa Castilla e Lic. Alberto Mendoza, pelas facilidades oferecidas para a realização de meus estudos de doutorado.

E o mais importante, a Deus, pois se não me guardasse e não me desse inteligência e discernimento para levar a bom termo este trabalho fisicamente teria desistido.

À minha adorada Mãe e Porfito, aos meus queridos irmãos: María Jesús, César Julio, Luis Antonio, Edit Isabel, Iván Ney, Tania Evelin, Ilich e Deinova, os meus sobrinhos: Erik, Iván, Carlos Antonio, Elsa Luz, Jorge Luis, Toninho, Luisin, MaryRoss, Daniel, Sofia, Joaquin Alonso, Joshua, Iván Julio, Jessica, Mafer, Macarena, Adriano e meus cunhados: Jorge, Mabel, Cleomar e José, por esperar me pacientemente e por me dar a força para continuar com meus objetivos.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária do IOC, FIOCRUZ, por dar-me a oportunidade de realizar meus estudos de doutorado.

Ao PEC-PG através da CAPES, pelo suporte financeiro para a minha permanência e manutenção durante a realização de meus estudos de doutorado e desenvolvimento deste trabalho, neste país.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Foto de um espécime adulto do *Echinococcus granulosus*, evidenciando o escólex e estróbilo com suas proglótes em diferentes estágios de desenvolvimento (modificado de WWW.facmed.unam.mx/.../echinocadulto.JPG).....2
- Figura 1.2.** Cisto hidático (A) e corte histológico (B) de *Echinococcus granulosus*:1). camada laminar; 2). camada germinativa; 3). vesículas prolíferas; 4). líquido hidático (conteúdo líquido do cisto). (modificado de http://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Echinococcus+Granulosus&lang=3;http://graphicwitness.medicalillustration.com/generatexhibit.php?ID=9020&TC=&A=58650).....3
- Figura 1.3.** Protoescólices de cisto hidático de ovino, observado em microscopia ótica a 400X (Laboratório de Zoonosis Parasitaria - INS - Peru).....5
- Figura 1.4:** Ciclo de vida do *E. granulosus*: 1) o verme adulto no intestino do cão; 2) os ovos são liberados no ambiente; 3) Os ovos ingeridos liberam as oncosferas que atingem os órgãos no hospedeiro intermediário; 4) desenvolvimento da metacestode, formação do cisto hidático e protoescólices; 5) ingestão do cisto hidático pelo cão; 6) evaginação de protoescólices no trato digestivo do cão, início da estrobilação e fixação no intestino delgado. O homem é hospedeiro acidental (modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Echinococcus.asp>).....6
- Figura 1.5.** Distribuição mundial do *Echinococcus granulosus* (Adaptado de Torgenson e Budke, 2003).....7
- Figura. 1.6.** Arvore filogenética de algumas espécies de *Echinococcus* e genótipos baseados no genoma mitocondrial mtDNA (dados de Lymbery, 1995, Cruz-Reyes et al.2007, Moks et al. 2007) extraído de Thompson, 2008.....19

Figura. 1.7. Representação esquemática do genoma mitocondrial circular de <i>Echinococcus granulosus</i> . A chave vermelha indica as regiões mais utilizadas para a caracterização das variantes genéticas de <i>E. granulosus</i> (modificado de McManus, 2004).....	22
Figura. 3.1. Mapa do Peru mostrando os locais onde foram coletados os isolados de <i>E. granulosus</i> para nosso estudo (disenho: Heloisa Nogueira – FIOCRUZ- Brasil).....	26
Figura. 3.2. Fígado e pulmão de hospedeiros intermediários infectados com cisto hidático (A ovelha e B boi) (foto: Sánchez E, Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, INS, Lima-Peru).....	27
Figura. 3.3. Obtenção de líquido do cisto hidático em condições assépticas (foto: Sánchez E, Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, INS, Lima-Peru).....	28
Figura. 3.4. Sedimento de líquido hidático contendo protoescolices e/ou camada germinativa (foto: Sánchez E, Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, INS, Lima-Peru).....	29
Figura. 4.1. Diferentes formas e tamanhos de ganchos rostelares de isolados de <i>E. granulosus</i> (foto. Sánchez E, Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, INS, Peru).....	77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1.** Principais linhagens de *Echinococcus granulosus* e os genótipos mitocondriais correspondentes. Os hospedeiros definitivos e intermediários. Distribuição geográfica e referências principais (modificado de Thompson e McManus, 2002).....17
- Tabela 3.1.** Isolados de *Echinococcus granulosus* empregado no estudo. Origem geográfica e hospedeira. Localização e fertilidade dos cistos hidático.....30
- Tabela 4.1.** Morfometria de ganchos rostelares de isolados de *Echinococcus granulosus*. Origem geográfica e hospedeiro. Assim como as medidas das estruturas dos ganchos.....78

ABREVIATURAS

adv	adventícia
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BLAT	Basic local alignment search tool
COI	Citocromo C oxidase subunidade 1
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Dexoxinucleotidio trifosfato
EC	Equinococose cística
g	Aceleração da gravidade
ITS-1	Internal Transcribed Spacer 1
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mtDNA	DNA mitocondrial
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrómetro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND1	NADH desidrogenase subunidade 1
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
ng	Nanogramas
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerasa)
pb	Pares de base
PBS	Tampón fosfato salino
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (Polimorfismo amplificado aleatória de DNA)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo em longitude

	dos fragmentos de restrição)
RNA	Acido ribonucleico
rDNA	DNA ribosomico
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism (Polimorfismo conformacional de uma simples fita)
<i>Taq pol</i>	Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
WHO	World Health Organization

LISTA DE ANEXOS

8.1. Eletroforese em gel de agarose a 1% corados com Brometo de Etídio de produtos de PCR-CO1 (450pb) de isolados de *E. granulosus* de diferentes hospedeiros intermediários das regiões endêmicas do Peru. 1: marcador de peso molecular (100bp); 2 controle negativo (água); 3,4 (Puno: boi, ovelha); 5,6 (Junín: boi, ovelha); 7,8 (Cusco: boi); 9,10 (Arequipa: boi, ovelha); 11,12 (Huancavelica: boi, ovelha); 13,14 (Ayacucho: ovelha); 15,16 (Humano); 17 controle positivo *E. granulosus* G1; 18 marcador de peso molecular (100bp).....97

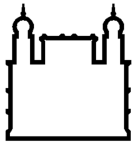
8.2. Eletroforese em gel de agarose a 1% corados com Brometo de Etídio de produtos de PCR-ND1 (cebadores: JB11-JB12) (550pb) de isolados de *E. granulosus* de diferentes hospedeiros intermediários das regiões endêmicas do Peru. 1: marcador de peso molecular (100bp); 2 controle negativo (água); 3,4 (Puno: boi, ovelha); 5,6 (Junín: boi, ovelha); 7 (Cusco: boi); 8,9 (Arequipa: boi, ovelha); 10,11 (Huancavelica: boi, ovelha); 12,13 (Ayacucho: ovelha); 14,15 (Humano); 16 controle positivo *E. granulosus* G1.....98

8.3. Eletroforese em gel de agarose a 1% corados com Brometo de Etídio de produtos de PCR-ND1 (cebadores: EL1F-EL1R) (800pb) de isolados de *E. granulosus* de diferentes hospedeiros intermediários das regiões endêmicas do Peru. 1: marcador de peso molecular (100bp); 2 controle negativo (água); 3,4 (Puno: boi, ovelha); 5,6 (Junín: boi, ovelha); 7,8 (Cusco: boi); 9,10 (Arequipa: boi, ovelha); 11,12 (Huancavelica: boi, ovelha); 13,14 (Ayacucho: ovelha); 15,16 (Humano); 17 controle positivo *E. granulosus* G1; 18 marcador de peso molecular (100bp).....98

INDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xii
INDICE	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
RESUMEN	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Gênero <i>Echinococcus</i>	1
1.2. <i>Echinococcus granulosus</i>	2
1.2.1. Fase adulta.....	2
1.2.2. Fase Larvar.....	3
1.3. Ciclo de vida e transmissão do <i>Echinococcus granulosus</i>	5
1.4. Distribuição do <i>Echinococcus granulosus</i>	6
1.5. Equinococose cística (hidatidose).....	7
1.6. Identificação de espécies e linhagens de <i>Echinococcus</i>	9
1.7. Variação intra-específica em <i>Echinococcus granulosus</i>	10
1.8. Principais linhagens de <i>Echinococcus granulosus</i> na America do Sul e Peru.....	18
1.9. Filogenia de <i>Echinococcus granulosus</i>	18
1.10. Técnicas moleculares para identificação de variantes.....	19
1.11. Principais marcadores moleculares.....	21
1.12. Importância epidemiológica das variantes.....	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Área de estudo.....	26
3.2. Coleta do material biológico.....	27
3.3. Exame microscópico dos cistos e morfometria dos ganchos rostelares.....	28
3.4. Obtenção dos protoscólices e/ou camada germinativa de <i>Echinococcus granulosus</i>	28

3.5. Análise molecular e filogenética.....	33
3.5.1. Análise de genótipos pelo gene mitocondrial citocromo Coxidase subunidade CO1: Artigo 1 publicado na Revista: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz..	33
Molecular characterization of <i>Echinococcus granulosus</i> from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene.....	34
3.5.2. Análise de genótipos pelo gene mitocondrial NADH desidrogenase Subunidade 1.....	40
Manuscrito 1: Predominance of <i>Echinococcus granulosus</i> G1 genotype in cattle, sheep and humans from endemic regions of Peru assessed by NADH desidrogenase subunit 1 gene analyze.....	41
3.5.3. Análise de genótipos pelos genes mitocondriais CO1 e ND1 das amostras adicionais.....	56
Manuscrito 2: <i>Echinococcus granulosus</i> genotypes circulating in alpaca (<i>Lama pacos</i>) and pigs (<i>Sus scrofa</i>) from endemic region of Peru.....	57
4. RESULTADOS.....	77
4.1. Análise das amostras de cistos hidático.....	77
4.2. Análise morfométrica dos ganchos rostellares.....	77
4.3. Análise molecular e filogenética.....	79
4.3.1. Resultados do análise pelo gene CO1: Artigo 1	
4.3.2. Resultados do análise pelo gene ND1: manuscrito 1	
4.3.3. Resultados do análise pelos genes CO1 e ND1 dos isolados de alpaca e porco: manuscrito 2.	
5. DISCUSSÃO.....	80
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
8. ANEXOS.....	97



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE *Echinococcus granulosus* ISOLADOS DE
HOSPEDEIROS DAS ÁREAS ENDÊMICAS DO PERU**

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

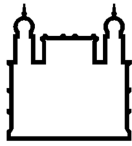
ELIZABETH LUZ SÁNCHEZ ROMANÍ

Echinococcus granulosus, o menor cestóide, é distribuído por todo o mundo. Este parasito, sob a forma de larva, é responsável pela equinococose cística (EC) ou hidatidose, uma das zoonoses de maior importância médica e veterinária que ocasiona grandes perdas econômicas nas regiões pecuárias e agrícolas. *E. granulosus* é caracterizado por apresentar uma alta variabilidade intra-específica que é associada com hospedeiros intermediários diferentes. Dez variantes intra-específicas ou genótipos distintos (G1-G10) foram definidos com base na diversidade genética. A identificação de variantes ou genótipos circulantes em diferentes hospedeiros das regiões endêmicas da EC é epidemiologicamente importante, porque diferentes características biológicas entre as variantes individuais podem influenciar no padrão de ciclo de vida, especificidade do hospedeiro, o tempo de desenvolvimento, antigenicidade, dinâmica de transmissão, sensibilidade a agentes quimioterápicos e patogênese, com implicações importantes para a epidemiologia, diagnóstico, tratamento e controle de endemia.

A região andina do Peru, que inclui as áreas de Puno, Junín, Arequipa, Cusco, Huanacavelica e Ayacucho, tem uma alta prevalência de EC. Para determinar as variantes ou genótipos de *E. granulosus* circulantes em hospedeiros intermediários das regiões endêmicas do Peru, foram coletadas amostras de cistos hidáticos de bovinos (44), ovinos (41) e humanos (14). Cistos hidáticos de alpaca (4) de Puno e porcos (8) de Ayacucho também foram incluídos neste estudo. DNA de todos os isolados (protoscólices e/ou camadas germinativas) de *E. granulosus* foram extraídos e usados para amplificar duas regiões de genes mitocondriais que codificam o citocromo C oxidase subunidade 1 (CO1) e NADH desidrogenase subunidade 1 (ND1). Produtos de PCR CO1 (450bp) e ND1 (550bp e 800bp) foram sequenciados e as sequências comparadas com as referências para *E. granulosus* encontrados na base de dados do GenBank. Análises filogenéticas também foram desenvolvidas.

Sequências parciais do gene CO1 (375bp) e ND1 (483bp e 747bp) mostraram que todos os isolados de bovinos, ovinos, alpaca e 4/8 isolados de porcos correspondem ao genótipo G1 (linhagem da ovelha comum). Três isolados de ovelhas de Ayacucho mostraram polimorfismo de apenas um nucleotídeo indicando a presença de uma microvariante do genótipo G1 de *E. granulosus*, a G1⁴. Quatro de oito sequências isoladas de porco de Ayacucho mostraram identidade com o genótipo G7 (linhagem suína) de *E. granulosus*. As análises filogenéticas das sequências dos genes CO1 e ND1 mostraram árvores semelhantes para ambos os genes, onde há um grupo albergando a maioria das sequências com o genótipo G1 e outro de quatro sequências isoladas de porco com o genótipo G7. Além disso, um grupo particular de três sequências isoladas de ovelhas provenientes de Ayacucho é agrupado com a microvariante G1⁴.

Os resultados obtidos neste estudo mostram a predominância do genótipo G1, em bovinos, ovinos, alpacas, porcos e seres humanos nas regiões endêmicas do Peru. A microvariante G1⁴ foi identificada pela primeira vez na América do Sul. Dois genótipos G1 e G7 podem infectar porcos de Ayacucho. Os dados mostrados devem ser considerados para que as medidas de prevenção e controle da EC sejam verdadeiramente eficazes nessas regiões.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MOLECULAR AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Echinococcus granulosus* ISOLATES FROM HOSTS OF THE ENDEMIC AREAS OF PERU

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

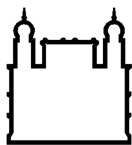
ELIZABETH LUZ SÁNCHEZ ROMANÍ

Echinococcus granulosus is a small cestode distributed worldwide and its larval stage is responsible for cystic echinococcosis (CE) or hydatidosis, a zoonosis of great medical and veterinary importance due to considerable economic losses of livestock in agricultural regions. *E. granulosus* is characterized by a high intraspecific variability that is associated with different intermediate hosts. Ten distinct genetic variants (G1-G10) have been defined based on molecular analysis. The identification of the genotypes circulating in different hosts from endemic regions of CE is epidemiologically important since each individual variant has different biological characteristics that can influence the life cycle pattern, host specificity, development rate, antigenicity, transmission dynamics, sensitivity to chemotherapeutic agents and pathology. These characteristics have important implications for the diagnosis, treatment and control of CE in endemic regions.

The Andean region of Peru, which includes the areas of Puno, Junín, Arequipa, Cusco, Huanacavelica and Ayacucho, has a high prevalence of CE. To determine the genotypes of the *E. granulosus* circulating through intermediate hosts within these endemic regions of Peru, samples of hydatid cysts were collected from cattle (44), sheep (41) and humans (14). Hydatid cyst of alpaca (4) from Puno and pigs (8) from Ayacucho also were included in this study. DNA was extracted from the protoscolex and/or germinal layers in all of the isolates and used as a template to amplify regions of two mitochondrial genes that encode cytochrome C oxidase subunit 1 (CO1) and NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1). PCR products of CO1 (450bp) and ND1 (550bp and 800bp) were sequenced and the sequences compared with the reference sequences of *E. granulosus* deposited in the GenBank data base. Phylogenetic analysis were also developed.

Partial sequences of the CO1 gene (375bp) and ND1 gene (483 bp and 747 bp) showed that all isolates from cattle, sheep, alpaca and 4/8 isolated from pigs correspond to the G1 genotype (common sheep strain). Three isolates of sheep from Ayacucho showed a single nucleotide polymorphism indicating the presence of a microvariant of the G1 genotype of *E. granulosus*, the G1⁴. Four of eight sequences of pig isolates from Ayacucho showed identity with the G7 genotype (pig strain) of *E. granulosus*. Phylogenetic analysis of the sequences of the genes CO1 and ND1 showed trees similar for both genes, where there is a grouping of most of the sequences with the G1 genotype and the other four sequences isolated from pigs with genotype G7. In addition, a particular group of sequences isolated from three sheep from Ayacucho is grouped with the G1⁴ microvariante.

The results obtained in this study show a predominance for the G1 genotype in cattle, sheep, alpacas, pigs and humans within endemic regions of Peru, the first identification of the microvariante G1⁴ in South America and demonstrate that the genotypes G1 and G7 can infect pigs. The data shown should be considered for the development and implementation of effective programs in endemic regions of Peru for the control and prevention of EC.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANÁLISIS MOLECULAR Y FILOGENÉTICO DE *Echinococcus granulosus* AISLADOS DE HOSPEDEROS DE LAS ÁREAS ENDÉMICAS DE PERU

RESUMEN

TESIS DE DOCTORADO

ELIZABETH LUZ SÁNCHEZ ROMANÍ

Echinococcus granulosus, el cestodo más pequeño está distribuido en todo el mundo. Este parásito en su estado larval es responsable de la equinococosis quística (EQ) o hidatidosis, una de las zoonosis de mayor importancia médica y veterinaria que ocasiona grandes pérdidas económicas en las regiones ganaderas y agrícolas. *E. granulosus* se caracteriza por presentar una gran variabilidad intra-específica asociada con los diferentes hospederos intermediarios. Diez variantes intra-específicas o genotipos distintos (G1-G10) han sido definidos en base a diversidad genética. La identificación de variantes o genotipos circulantes en diferentes hospederos de las regiones endémicas de EQ es epidemiológicamente importante, porque diferentes características biológicas entre las variantes individuales pueden influir en los patrones del ciclo de vida, especificidad del hospedero, tiempo de desarrollo, antigenicidad, dinámica de transmisión, sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos y patología, con implicaciones importantes para la epidemiología, diagnóstico, tratamiento y control de la endemia.

La región andina de Perú, que incluye las áreas de Puno, Junín, Arequipa, Cusco, Huancavelica y Ayacucho, tiene una alta prevalencia de EQ. Para determinar las variantes o genotipos de *E. granulosus* que circulan en los hospederos intermedios dentro de las regiones endémicas del Perú, fueron colectadas muestras de quistes hidatídicos de bovinos (44), ovinos (41) y humanos (14). Quiste hidatídico de alpaca (4) de Puno y cerdos (8) de Ayacucho también fueron incluidos en este estudio. ADN de todos los aislados (protoescolices y/o membrana germinativa) de *E. granulosus* fueron extraídos y usados para amplificar dos regiones de genes mitocondriales que codifican el citocromo C oxidasa subunidad 1 (CO1) y NADH deshidrogenasa subunidad 1 (ND1). Productos de PCR CO1 (450pb) y ND1 (550bp y 800bp) fueron secuenciados y las secuencias comparadas con las referencias para *E. granulosus* encontrados en la base de datos del GenBank. Análisis filogenéticos también fueron realizadas.

Secuencias parciales del gene CO1 (375bp) y ND1 (483 pb y 747bp) mostraron que todos los aislados de bovinos, ovinos, alpacas y 4/8 aislados de cerdos corresponden al genotipo G1 (cepa oveja común). Tres aislados de ovejas de Ayacucho mostraron polimorfismo de nucleótido único indicando la presencia de una microvariante del genotipo G1 de *E. granulosus*, la G1⁴. Cuatro de las ocho secuencias aislados de cerdos de Ayacucho mostraron identidad con el genotipo G7 (cepa porcina). Los análisis filogenéticos de las secuencias de los genes CO1 y ND1 mostraron árboles semejantes para ambos genes, donde hay un grupo que incluye la mayoría de las secuencias con el genotipo G1 y otro de cuatro secuencias aislados de cerdo con el genotipo G7. En adición, un grupo particular de tres secuencias aislados de ovejas provenientes de Ayacucho es agrupado con la microvariante G1⁴.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la predominancia del genotipo G1 en bovinos, ovinos, alpacas, cerdos y seres humanos dentro de las regiones endémicas del Perú. La microvariante G1⁴ fue identificada por primera vez en América del Sur. Dos genotipos G1 y G7 pueden infectar cerdos en Ayacucho. Los datos mostrados deben ser considerados para que las medidas de prevención y control de la EQ sean verdaderamente eficaces en estas regiones.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Gênero *Echinococcus* (Rudolphi, 1801)

Os membros do gênero *Echinococcus*, como os demais Platyhelminthes, são animais triploblásticos, acelomados, achatados dorsoventralmente, com simetria bilateral, sem sistema digestivo desenvolvido e sistema excretor de tipo protonefridial. Dentro deste gênero, quatro espécies são taxonomicamente reconhecidas: *Echinococcus granulosus* Batsch, 1786, *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, *Echinococcus oligarthrus* Diesing, 1863 e *Echinococcus vogeli* Rausch and Bernstein, 1972. Estas espécies são morfologicamente distintas, tanto no estágio adulto como no estágio de larva (Gemmell, 1997). A taxonomia do gênero foi revista e duas linhagens de *E. granulosus* foram promovidas à espécies, *Echinococcus equinus* Williams and Sweatman, 1963 (Thompson and McManus 2002) parasitos de cavalo na Europa e *Echinococcus ortleppi* Lopez-Neyra and Soler Planas, 1943 (Thompson and McManus, 2002) parasitos de gado bubalinos na Itália. Recentemente, uma nova espécie *Echinococcus shiquicus*, foi descrita parasitando raposas do Tibete na Ásia (Xiao et al. 2005). Pelo menos uma espécie do gênero *Echinococcus* ocorre em todos os continentes habitados do mundo (Jenkins et al. 2005).

Classificação Sistemática:

Filo Platyhelminthes

Classe Cestoda

Subclasse Eucestoda

Ordem Cyclophyllidea

Família Taenidae

1.2. *Echinococcus granulosus* (Batsch 1786)

1.2.1. Fase adulta

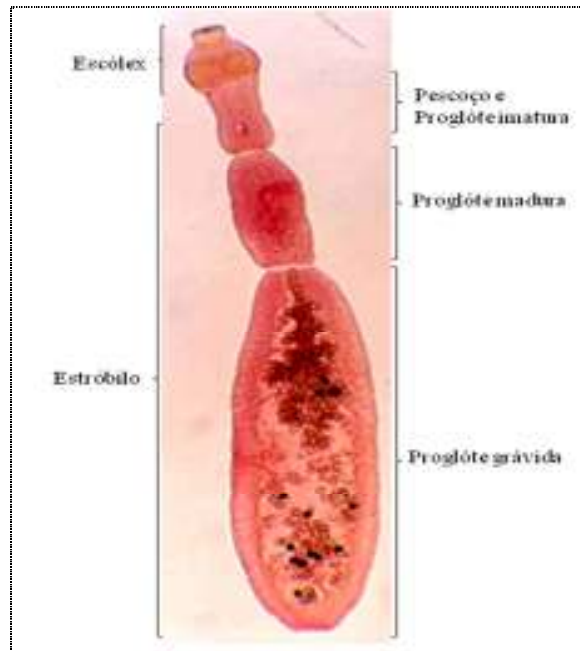


Figura 1.1 Foto de um espécime adulto do *Echinococcus granulosus*, evidenciando o escólex e estróbilo com suas proglotes em diferentes estágios de desenvolvimento (Modificado de www.facmed.unam.mx/.../echinocadulto.jpg)

O *E. granulosus* é o menor cestóide da família Taenidae entre os de interesse médico, tendo um comprimento médio entre 2 a 7 mm. Apresenta morfologia característica, possuindo escólex com 4 ventosas e rostro com acúleos e raramente apresentam mais do que cinco proglotes (Figura 1.1). O escólex é composto por uma dupla coroa de ganchos rostellares e por quatro ventosas musculares, que são as principais estruturas de fixação à parede do intestino do hospedeiro definitivo (WHO/OIE, 2001). O pescoço encontra-se localizado na parte posterior do escólex sendo curto e delgado constituindo a região de crescimento (região proliferativa) dos proglotes. O corpo ou estróbilo é constituído externamente por um tegumento que possui função protetora e através do qual o parasito também absorve os nutrientes e elimina produtos de excreção, sendo segmentado e apresentando as estruturas reprodutivas. Na proglote madura podem ser identificados o sistema reprodutor sexuado masculino e feminino (testículos e ovários)

uma vez que são organismos hermafroditas. A proglote grávida apresenta-se repleta de ovos contendo as oncosferas infectante (WHO/OIE, 2001). As oncosferas apresentam formato sub-esférico com diâmetro entre 30 a 36µm, identificando-se no seu interior três pares de ganchos o que lhes permitem serem denominadas embrião hexacanto (WHO/OIE, 2001).

O *E. granulosus* na fase adulta, parasita o intestino delgado de carnívoros (hospedeiro definitivo) sendo sempre canídeos (cães, lobos, dingos). Fatores físicos, como a composição da bile e mecanismos imunológicos são determinantes para o desenvolvimento e maturação do parasito adulto nos seus hospedeiros vertebrados (Thompson et al. 1995). Por ser hermafrodita, o parasito adulto é capaz de auto-fecundação. A auto-inseminação parece ser um requisito evolutivo importante para o parasito, devido à dificuldade em encontrar outro verme adulto fértil no intestino do hospedeiro. Porém, estudos realizados por Thompson and Lymbery (1988) sugerem a ocorrência tanto de auto-fecundação quanto de fecundação cruzada neste parasito.

1.2.2. Fase larvar

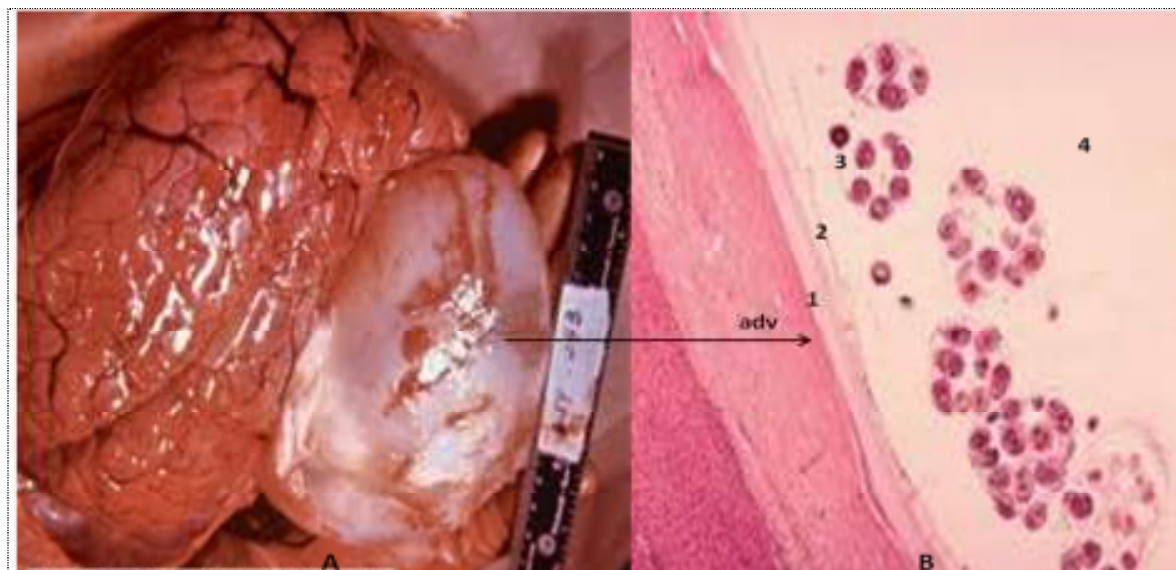


Figura 1.2. Cisto hidático (A) e corte histológico (B) de *Echinococcus granulosus*: 1) camada laminar; 2) camada germinativa; 3). vesículas proligeras; 4) líquido hidático (conteúdo líquido do cisto), Adv = adventícia (Modificado de http://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Echinococcus+Granulosus&lang=3; <http://graphicwitness.medicalillustration.com/generatexhibit.php?ID=9020&TC=&A=58650>)

A fase larvar ou metacestóide de *E. granulosus* constitui a formação vesicular mais volumosa (cisto hidático) de todos os cestódeos de interesse médico e se reproduz assexuadamente (Figura 1.2). O metacestóide ou cisto hidático completamente desenvolvido é tipicamente unilocular e repleto de líquido, denominado de líquido hidático. O cisto é constituído externamente por uma camada laminar acelular resistente e elástica, isolando-o e protegendo-o dos mecanismos de defesa do hospedeiro e permitindo a passagem de nutrientes indispensáveis para o desenvolvimento do parasito. Esta é seguida por uma camada germinativa nuclear e estratificada que reveste o cisto hidático internamente, sendo responsável pela proliferação assexuada do parasito. As vesículas prolíferas, originam-se da camada germinativa, formando-se por multiplicação celular que vão vacuolizando progressivamente para o interior do cisto dando origem aos protoscólices. Os protoscólices são formas rudimentares ou potenciais vermes adultos, que apresentam no interior uma coroa de ganchos e esboço das quatro ventosas de fixação (Figura 1.3). Cada protoscólices tem a capacidade de desenvolver um novo parasito adulto. As vesículas filhas são formações que reproduzem inteiramente as hidátides mães; diferem estruturalmente das vesículas prolíferas por apresentar camada cuticular envolvente. Líquido hidático é a substância de preenchimento do cisto hidático no qual se encontram os elementos figurados tais como: vesículas prolíferas, protoescólices e vesículas filhas. A sua formação resulta das secreções e excreções do parasita e transudado do tecido do hospedeiro, contendo assim compostos comuns ao soro do hospedeiro, mas em diferentes concentrações (WHO/OIE, 2001). A adventícia é a camada composta de tecido conjuntivo e fibroblastos formados pelo hospedeiro em resposta à presença do parasito.

A fase larvar ou metacestóide de *E. granulosus* se desenvolve em órgãos internos dos hospedeiros intermediários, principalmente ungulados domésticos (ovelha, cabra, boi, porco entre outros) ou selvagens (cervídeos) e acidentalmente no homem. Esta fase é a forma patogênica do parasito conhecida como equinocose cística e também é a forma infectante para o hospedeiro definitivo.



Figura 1.3. Protoscólices do cisto hidático de ovino, observado em microscopia de luz a 40X. (foto: Sánchez E. Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria - INS - Peru).

1.3. Ciclo de vida e transmissão

O *E. granulosus*, como os demais membros do gênero requerem dois hospedeiros mamíferos para completar seu ciclo de vida. Um hospedeiro definitivo (cão doméstico e outros canídeos) e outro o hospedeiro intermediário (ovelhas, bois, cabras, porcos, entre outros). O homem é um hospedeiro acidental (Figura 1.4). Quando o cão doméstico é parasitado pelo verme adulto, segmentos contendo ovos (proglotes grávidas) ou ovos livres são eliminados nas fezes, contaminando assim o ambiente tais como: pastos, à água, e outro alimentos, os ovos ainda podem se encontrar no pelo do próprio cão ou podem ser ingeridos pelo hospedeiro intermediário, junto com alimentos. No intestino delgado do hospedeiro intermédio, libera-se a oncosfera, que penetra a parede intestinal e é carreada através do sistema circulatório para vários órgãos, principalmente os pulmões e o fígado. Nesses órgãos, a oncosfera torna-se cisto hidático. Acidentalmente os ovos também podem ser ingeridos por seres humanos. O ciclo se completa quando o cão (hospedeiro definitivo) alimenta-se com vísceras do hospedeiro intermediário infectado com cistos. Estes cistos normalmente contem numerosos protoscólices. Os protocólices no intestino delgado do cão transformam-se em parasitos adultos. No meio doméstico o ciclo é mantido pela prática de alimentar os cães com as vísceras infectadas de animais abatidos nas propriedades rurais.

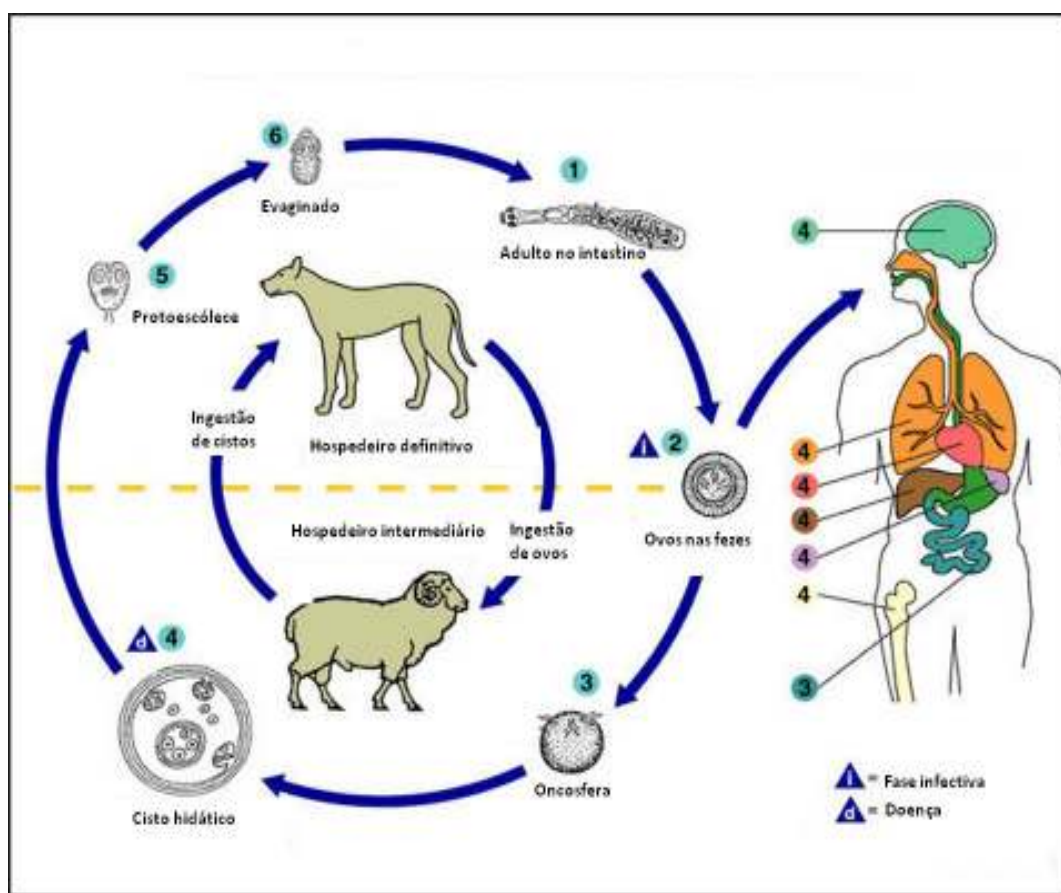


Figura 1.4: Ciclo de vida do *E. granulosus*: 1) o verme adulto no intestino do cão; 2) os ovos são liberados no ambiente; 3) Os ovos ingeridos liberam as oncosferas que atingem os órgãos no hospedeiro intermediário; 4) desenvolvimento do metacestóide, formação do cisto hidático e protoescolices; 5) ingestão do cisto hidático pelo cão; 6) evaginação de protoescolices no trato digestivo do cão, início da estrobilação e fixação no intestino delgado. O homem é hospedeiro acidental. (modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Echinococcus.asp>).

1.4. Distribuição de *Echinococcus granulosus*

Echinococcus granulosus tem uma elevada capacidade de adaptação a hospedeiros, tanto definitivos como intermediários, por isso, a distribuição deste parasito é cosmopolita, produzindo diversos níveis de prevalência de equinococose cística no homem e nos animais (Romig, 2003). Prevalências altas são observadas na África, Ásia, Austrália, algumas regiões da Europa e América do Sul (Fig. 1.5). Na América do Sul a distribuição do parasito é extensa,

particularmente na Argentina, Uruguai, Sul do Brasil, Peru e Chile. No Peru, a região centro e sul dos Andes é a principal região de criação de gado e oferece todas as condições necessárias para a dispersão da equinococose cística nesta região, sendo que esta enzootia está difundida em ovelha, boi, porco e alpacas. O cão rural, urbano e pastor dessa região é o principal hospedeiro do *E. granulosus* (Zapatel et al. 1962, Moro et al. 1997).

Na Islândia, Nova Zelândia, Tasmânia e sul do Chipre, o parasita foi efetivamente erradicado (Torgenson and Budke, 2003).

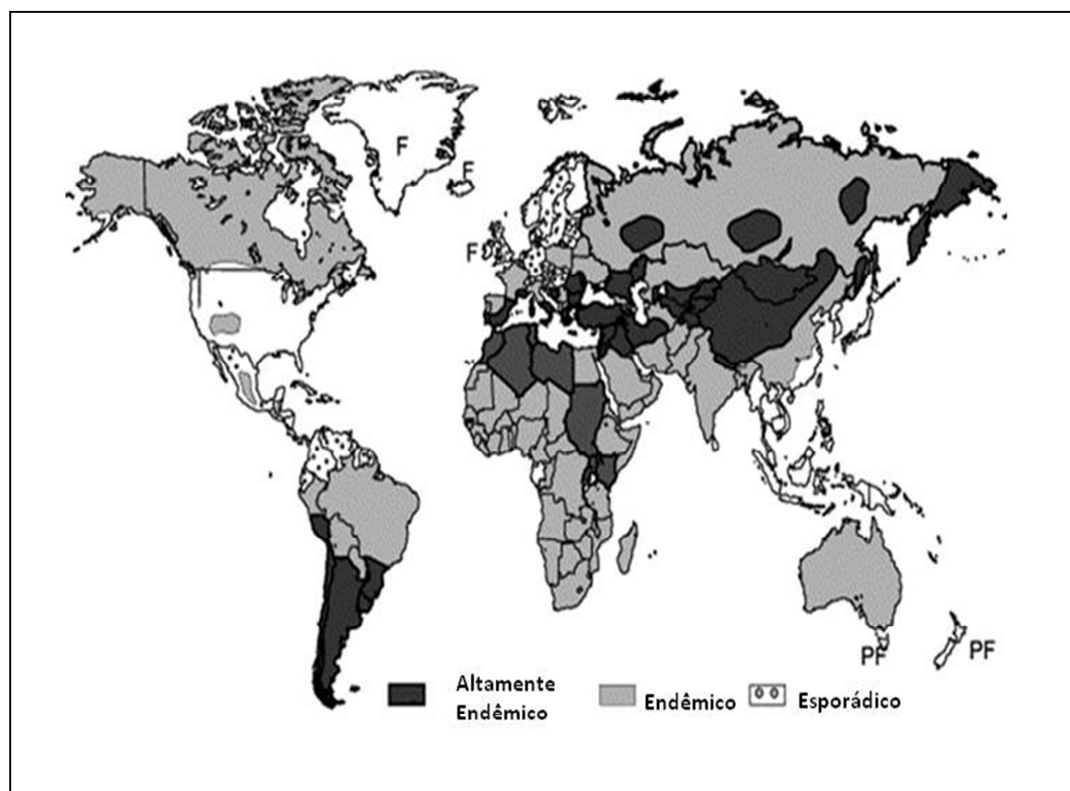


Figura 1.5. Distribuição mundial do *Echinococcus granulosus* (Modificado de Torgenson and Budke, 2003)

1.5. Equinococose cística (hidatidose)

A equinococose cística (EC) é a manifestação clínica do parasitismo pela fase larvar ou cisto hidático de *E. granulosus* nos hospedeiros intermediários (ovelha, boi, cabras, porcos entre outros). Por se tratar de uma zoonose, o homem também é infectado e desenvolve a doença

(Schantz et al. 1995). A EC ocorre na maioria dos continentes e é um importante problema de saúde pública e veterinária, com impacto na economia e produção animal, principalmente em áreas onde há criação extensiva de gado e de ovino. No homem, os cistos podem se desenvolver em diferentes órgãos, principalmente no fígado e/ou pulmões, tendo sido relatados casos de localização no cérebro, ossos, rins, coração e demais órgãos. Os cistos produzidos por *E. granulosus* são uniloculares e o tamanho varia entre 1 a 15 cm, mas cistos maiores (20 cm de diâmetro) também já foram relatados (Eckert and Deplazes, 2004). A EC em humanos geralmente é assintomática e as manifestações clínicas vão depender da localização e o tamanho do cisto. As principais manifestações são devidas principalmente à compressão física que o desenvolvimento do cisto exerce sobre os órgãos do hospedeiro. A ruptura do cisto pode ocorrer em qualquer localização, podendo provocar infecções bacterianas secundárias e/ou a disseminação das protoscólices por todo o organismo, originando uma equinococose cística secundária múltipla, reações anafiláticas de intensidade variável e inclusive a morte do hospedeiro (Eckert and Desplazes, 2004). O diagnóstico clínico da EC é considerado difícil pela inespecificidade dos sintomas. Quando o cisto atinge certo tamanho torna-se possível detectar por técnicas de imagens (radiografia, tomografia computadorizada, ultra-sonografia ou ressonância magnética) ou ainda se confirmar pela detecção de anticorpos específicos no soro mediante testes imunológicos (Dupla Difusão Arco 5, Aglutinação de Latex, Imunoensaio Enzimático, Immunoblot) (Eckert and Desplazes, 2004). As opções de tratamento para o EC incluem a remoção cirúrgica das lesões, tendo uma taxa de sucesso de até 90% (Pawlowski et al. 2001). Uma alternativa à cirurgia é a quimioterapia, usando benzimidazóis, para os casos em que não é recomendada a cirurgia (WHO/OIE, 2001). O desenvolvimento de vacinas para os hospedeiros intermediários tem sido assunto de diversas pesquisas. Gauci et al. (2005) utilizaram uma proteína recombinante expressa na oncosfera (EG95) para conseguir níveis de proteção satisfatório em rebanhos de ovinos e caprinos. Contudo, os altos custos de produção impedem a aplicação em larga escala deste recurso. Um controle efetivo só será possível pela associação de programas de vacinação com medidas sanitárias adequadas (Torgerson, 2006).

No Peru, a EC causada pelo *E. granulosus* é endêmica, principalmente na região centro-sul dos Andes, onde a agropecuária é uma das principais atividades econômicas. Os danos desta zoonose estendem-se além do paciente, e atinge a economia regional e nacional afetando a saúde do homem na fase de desenvolvimento e, portanto na faixa etária mais produtiva (20 a 45 anos de idade), diminuindo o desempenho no trabalho. Também causa graves prejuízos a pecuária, ao

interferir no desenvolvimento dos animais e na produção e qualidade da lã e do leite (Otarola, 1966). Algumas das práticas que levam a altos riscos da EC nas áreas endêmicas do Peru incluem a manipulação pós-abate domiciliar do gado infectado, a alimentação dos cães com vísceras infectadas com cistos hidáticos, a disposição inadequada das vísceras infectadas com cistos hidáticos e o estreito relacionamento das pessoas com cães infectados com o parasito (Moro et al. 2008). Na década de 70, foi criado um programa piloto nos Andes centrais do Peru visando diminuir a incidência da infecção em hospedeiros definitivos e intermediários. Em 1980, quando o programa de controle cessou, a prevalência de infecção equinocócica em cães e ovelhas apresentava taxas de 1,6% e 5%, respectivamente (Moro et al. 1997). Porém, estes esforços foram descontinuados há mais de 20 anos, devidos em grande parte à instabilidade política do país. Atualmente não existe nenhum programa formal de controle da EC no Peru. Estudos recentes realizados neste país tem demonstrado alta incidência da EC em seres humanos de 7 a 11/100,000 habitantes, com prevalência altas em animais (51 a 79%), particularmente na região centro-sul dos Andes. (Moro et al. 1997, Perez, 2007).

1.6. Identificação de espécies e linhagens de *Echinococcus*

Crítérios morfológicos e biométricos como o tamanho, forma e posição dos ganchos do protoscólices, além do comprimento total, número de proglotes, comprimento da proglote grávida, posição do poro genital, número e distribuição dos testículos, forma e tamanho do bolsa do cirro, e forma do ovário no parasito adulto constituem critérios de diagnóstico. A forma de metacestóide de *Echinococcus* tem sido mais utilizada para a caracterização no nível de espécie, muitas vezes em combinação com aspectos biológicos e epidemiológicos (Eckert et al 1993). Embora estudos morfológicos e biológicos tenham permitido identificar caracteres seguros para o diagnóstico das espécies, tem que se considerar que a inconsistência de algumas dessas características, determinada em parte pelo hospedeiro que alberga o parasito, além de fatores ambientais pode dificultar a identificação a nível específico não necessariamente podendo refletir distinção a nível genético (Hobbs et al, 1990; Bowles and McManus, 1993a). Critérios bioquímicos e uso de marcadores isoenzimáticos também tem sido empregado mostrando serem valiosos para a identificação do polimorfismo dentro de *E. granulosus* (LyMBERY and Thompson, 1988; Bowles and McManus, 1993a). Porém a identificação das linhagens é mais complexa e baseia-se em uma combinação de critérios morfológicos, biológicos, bioquímicos e

características epidemiológicas. Atualmente técnicas moleculares têm permitido a caracterização a partir do genoma do parasita, possibilitando identificar variações associadas ao hospedeiro e/ou ambiente (Bowles et al. 1992, Bowles and McManus, 1993c, McManus, 2002).

1.7. Variação intra-específica em *Echinococcus granulosus*

Uma característica importante da biologia de *E. granulosus* é o fato de apresentar a maior variação intra-específica, quando comparado as demais espécies do gênero (McManus and Thompson, 2003). O termo linhagem ou “cepa” tem sido usado para descrever variantes entre populações dentro da espécie com semelhanças de genes ou sequências de DNA, com um ou mais caracteres de significância para a epidemiológica e o controle da equinococose cística (Thompson and Lymbery, 1988). Até a atualidade, estudos moleculares identificaram 10 genótipos distintos (G1 a G10), dentro da espécie de *E. granulosus* (Tabela 1.1). Embora o termo linhagem tenha sido cunhado com base no hospedeiro intermediário em que foi isolado, sendo que a mesma linhagem pode ser encontrada infectando diferentes espécies hospedeiras. Por exemplo, a linhagem da ovelha infecta, além de ovelhas, boi, cabras, porcos e é a principal causa de infecções em humanos (Schantz et al. 1995). Estes 10 genótipos descritos para *E. granulosus* se enquadram na definição acima, visto que apresentam diferenças na distribuição geográfica, no grau de infectividade para diferentes hospedeiros e nas sequências dos genes mitocondriais citocromo C oxidase subunidade 1 (CO1) e NAD desidrogenase subunidade 1 (ND1) (Bowles et al. 1992, Bowles and McManus, 1993c, Scott et al. 1997, Lavikainen et al. 2003).

A linhagem ovelha comum (genótipo G1). - Está amplamente distribuída e tem especial importância em países da América do Sul, Europa Meridional e Norte Oriental de África, Ásia e regiões australianas. Vários estudos têm demonstrado que a linhagem de *E. granulosus* obtida da ovelha difere na sua morfologia e biologia em relação as outras linhagem (Thompson et al. 1995). Os hospedeiros intermediários desta linhagem não se limitam unicamente às ovelhas, mas incluem outros mamíferos como bois, cabras, camelos, porcos entre outros. Além disso, a linhagem ovelha mostra características próprias de cada localidade, em comparação com outras linhagens de *E. granulosus* em outras áreas endêmicas (Thompson et al. 1995). Existem situações epidemiológicas definidas e confirmadas por estudos moleculares, que mostram que a linhagem ovelha é altamente infectante para seres humanos. Até o presente, grande parte do material de *E.*

granulosus obtidos de pacientes humanos através de cirurgias correspondem à cepa ovelha. Existem também informações da presença de diversas microvariantes, isto é, genótipos contendo poucas mutações em relação aos genótipos mais comuns, estas são, G1A, G1B, G1C, G1D, G1E descritos na Argentina (Kamenetzky et al. 2002) e G1¹, G1², G1³, G1⁴ descritos na Turquia (Vural et al. 2008).

A linhagem ovelha da Tasmânia (genótipo G2). - Inicialmente foi identificada apenas parasitando ovinos da Tasmânia (Bowles et al. 1992), esta linhagem envolve no seu ciclo o cão e a raposa como hospedeiro definitivo e a ovelha como hospedeiro intermediário (Eckert and Tompson 1997). Sabe-se que também pode infectar humanos causando problemas de saúde pública. Estudos moleculares sugerem que a forma biologicamente atípica de *E. granulosus* da Tasmânia tenha divergido relativamente há pouco tempo a partir da linhagem ovelha comum, possivelmente sob a influência de mudança das condições ambientais, tais como tratamento intensivo do hospedeiro definitivo com helmintídeos durante o controle da doença na Tasmânia (McManus and Thompson 2003). Estudos recentes têm demonstrado que a linhagem da Tasmânia também está presente na Argentina infectando tanto o homem como as ovelhas. Esta linhagem possivelmente foi introduzida com ovelhas Merino, exportadas da Tasmânia para a Argentina a partir do século passado, já que Argentina nunca exportou ovelhas para a Austrália (Rosenzvit et al. 1999, Kamenetzky et al. 2002). A linhagem ovelha da Tasmânia também foi reportada em ovelhas e bovinos na Romênia (Bart et al. 2006). Já na Itália foi reportada pela primeira vez em búfalos da água (*Bubalus bubalis*) (Rinaldi et al. 2008).

A linhagem búfalo (genótipo G3). - Em muitos países asiáticos os búfalos desempenham um papel importante como hospedeiros intermediários de *E. granulosus*. Estudos moleculares tem mostrado que os búfalos são suscetíveis aos genótipos G1 e G5 de *E. granulosus* (Bowles and McManus, 1993a). Tem sido relatada a presença destes genótipos em algumas regiões (Sardenia, Latium e Pied-mont) da Itália, com base em estudos moleculares (Busi et al. 2007). Rinaldi et al. (2008) reportaram a presença do genótipo G3 em isolados de *E. granulosus* de búfalos da água em gado no sul da Itália, enquanto Simek et al. (2010) reportaram o mesmo genótipo em isolados de gado na Turquia. Sharbatkori et al (2011) mostraram o genótipo G3 em isolados de camelos da região central de Irã. Na América do Sul, foi demonstrada pela primeira vez a presença do

genótipo G3 em isolados de humanos e no verme adulto de cão, no sul de Brasil (De la Rue et al. 2011).

A linhagem cavalo (genótipo G4). - Esta linhagem ocorre em vários países da Europa, no Oriente Médio, África do Sul e Nova Zelândia e possivelmente também no EUA (Eckert et al. 1997). Estudos comparativos entre isolados de países europeus (Reino Unido, Espanha, Itália), África do Sul e Nova Zelândia mostraram a uniformidade morfológicas da linhagem cavalo (Kumaratilake et al. 1986). A identidade genética foi confirmada em estudos independentes, utilizando diferentes técnicas (Bowles et al, 1992, Bowles and McManus, 1993c, Bowles et al. 1995). O cão parece ser o único hospedeiro definitivo da linhagem cavalo. O número de espécies de hospedeiros intermediários é pequena e pode incluir o cavalo e outros equinos. No hospedeiro intermediário, o fígado é o local onde predomina a infecção com metacestóides mas os pulmões e outros órgãos também podem ser afetados. Há evidências de que esta linhagem tem baixa ou nenhuma infectividade em sua fase larvar para ovinos, bovinos e o homem (Eckert and Thompson, 1997). A linhagem cavalo foi a primeira a ser proposta como uma nova espécie, *E. eqüinus*, devido a sua distinção genética e de desenvolvimento (Williams and Sweatman, 1963, Thompson et al. 1995). Em subsequente revisão taxonômica do gênero Rausch (1967) invalidou *E. eqüinus* como espécie, uma vez que ocorreu simpatricamente com as outras subespécies de *E. granulosus*. Recentemente esta linhagem foi revalidada como espécie uma vez que só ocorre em cavalos, e apresenta sequências nucleotídicas de marcadores mitocondriais e nucleares divergentes em relação as demais espécies (Thompson and Mc Manus, 2001, Gonzalez et al. 2002, Thompson and McManus, 2002 Lavikainen et al. 2003, Obwaller et al. 2004, Romig et al. 2006; Jenkins et al. 2005, Nakao et al. 2007, Moks et al. 2008).

A linhagem bovina (genótipo G5). - Em muitas partes do mundo, o gado bovino é um hospedeiro acidental para *E. granulosus* de origem de ovelhas e os cistos em bovinos não apresentam desenvolvimento e raramente são férteis (Thompson et al. 1995). Porém, em partes da Europa, América do Sul e África, o genótipo G5 parece ser adaptada ao gado bovino como seu principal, ou único hospedeiro intermediário e o cão como seu hospedeiro definitivo de importância epidemiológica (Eckert e Thompson, 1988, Worbes, 1992). Em bovinos, os cistos metacestóide são localizados predominantemente nos pulmões e mais de 90% deles contém protoscólices viáveis e infectantes para os seres humanos (Eckert and Thompson, 1988; Worbes, 1992). A

forma bovina presente na África do Sul foi inicialmente descrita como a espécie *E. ortleppi* por Lopez-Neyra and Soler Planas (1943) com base na morfologia de vermes adultos originalmente descrito por Ortlepp em 1934. Mais uma vez, o status taxonômico desta forma foi questionado (Rausch and Nelson, 1963) por apresentar limitadas características morfológicas. Somente 40 anos mais tarde, os resultados de infecções experimentais e caracterização molecular confirmaram que os taxonomistas anteriores estavam corretos quanto a validade da espécie (Thompson et al, 1984, Bowles et al. 1995, Thompson and McManus, 2001). Graças aos taxonomistas iniciais não foi necessário inventar um nome "novo" para esta forma de *Echinococcus*. Lopez-Neyra Soler e Planas (1943) já tinham proposto que fosse chamado *E. ortleppi*. Assim, *E. ortleppi* é agora aceito como o nome mais apropriado para a espécie da linhagem bovina (genótipo G5) (Thompson and McManus 2002, Lavikainen et al. 2003, Obwaller et al. 2004, Romig et al- 2006, Jenkins et al. 2005, Nakao et al. 2007.; Moks et al. 2008, Thompson, 2008). Recentemente na América do Sul, de La Rue et al. (2006) tem fornecido dados úteis sobre a distribuição e prevalência de *E. ortleppi* no Sul de Brasil e Kamenetzky et al. 2002 na Argentina. Por outro lado Marvilla et al. (2004) reportam um caso em humanos desta espécie na região central do México.

Linhagem camelo (genótipo G6).- O camelo é um importante hospedeiro intermediário de *E. granulosus* em toda a África e Oriente Médio envolvendo em seu ciclo de vida cães como hospedeiro final (Eckert et al. 1989). O *E. granulosus* obtido a partir de camelos africanos apresentam rápido desenvolvimento em cães (período pré-patente aproximadamente 40 dias) e mostram também diversas características morfológicas que permitem diferencia-los dos demais genótipo. Morfologicamente os isolados de camelo são facilmente distinguidas dos isolados de cavalos e ovelhas, mas apresenta certas semelhanças com a linhagem bovina (Eckert et al. 1989). A caracterização molecular de isolados de *E. granulosus* de camelos provenientes do Oriente Médio, Quênia, Sudão e Somália, confirmam sua homogeneidade genética, entretanto diferem geneticamente quando comparados com as linhagens bovinas e ovelhas (Thompson and Lymbery, 1991, Bowles et al. 1992, Eckert et al. 1997). Os cães são hospedeiros definitivos para a linhagem camelo de *E. granulosus* (Eckert et al. 1989), sendo que os camelos e cabras constituem os hospedeiros intermediários. Nos camelos, o pulmão é o local predominante dos cistos hidáticos, e é menos frequente no fígado e outros órgãos. A taxa de fertilidade no cistos dos pulmões é geralmente elevada (mais de 90%) e muito inferior no fígado (Eckert et al. 1989).

Estudos moleculares de isolados de *E. granulosus* de humanos das diferentes regiões de Turquia e Quênia não fornecem evidências da linhagem autóctone de camelo (Wachira et al. 1993). Atualmente estudos moleculares mostram que a linhagem camelo é infectante também para cabras e para seres humanos na China (Zhang et al. 2005), na Argentina (Rosenzvit et al. 1999, Kamenetzky et al. 2002, Soriano et al. 2010), no Chile (Manterola et al. 2008) e no Peru (Santivañez et al. 2008, Moro et al. 2009).

A linhagem suína (genótipo G7). - Em alguns países da Europa Central e Oriental, incluindo partes da Rússia (Eckert and Thompson, 1988) e no México (Schantz et al. 1995) foram observados um ciclo de *E. granulosus* cão/porco, sendo que este fato pode representar um importante ciclo para a perpetuação da infecção em certas áreas. Estudos de isolados de *E. granulosus* obtidos de porcos na Polônia mostram a identidade da linhagem suína (Eckert and Thompson, 1997). Vários estudos têm mostrado que ovos de *E. granulosus* da linhagem suína são altamente infectantes para os porco, mas tem infectividade muito menor para os cordeiros e bezerros (Eckert and Thompson, 1988). Em porcos os metacestódes de *E. granulosus* são encontrados principalmente no fígado e menos frequente nos pulmões ou outros órgãos internos. Existe pouca informação sobre o potencial de infectividade da linhagem suína para seres humanos. Porém estudos moleculares realizados recentemente mostram o encontro da linhagem suína em isolados de *E. granulosus* de pacientes da República de Slovakia (Turcekova et al. 2003). Por outro lado, uma inesperada alta prevalência do genótipo G7 foi relatada em isolados de pacientes na Europa Central (Schneider et al. 2010). Estudos de caracterização molecular em isolados de porco na Sardenha (Varcasia et al. 2006), em isolados de porcos, cabras e javali na Espanha (Gonzales et al. 2002, Mwambete et al. 2004), em isolados de porcos no México (Villalobos et al. 2007) e na Slovakia (Snabel et al. 2000) assim como em isolados de javali da Ucrânia (Kedra et al. 2000) também identificaram o genótipo G7 de *E. granulosus*.

A linhagem cervídea (genótipo G8). - É conhecido que a linhagem cervídea de *E. granulosus* tem uma ampla distribuição nas zonas de maior latitude da América do Norte e da Eurásia (Eckert and Thompson, 1988, Thompson and Lymbery, 1988, Rausch, 1995, Schantz et al. 1995). Anteriormente, duas subespécies morfologicamente distintas foram descritas na América do Norte, ou seja, *E. granulosus canadensis* no ciclo renas-cão e *E. granulosus borealis* no ciclo alces-lobo/cão (Sweatman and Williams, 1963). O primeiro foi sugerido para ser uma subespécie

introduzida a partir de Escandinávia, e a segunda uma forma indígena Norte-Americana. Mais tarde, dois genótipos distintos foram encontrados. A linhagem de cervídeos (G8) foi caracterizada geneticamente por Bowles et al. (1994) em isolados de cistos hidáticos de alce (*Alces alces*) da América do Norte. O ciclo natural é perpetuado pela relação predador-presa entre o lobo e ungulados da família Cervidae, de tamanho grande como o alce (*Alces alces*), renas (*Rangifer tarandus*) e veado comum (*Cervus elaphus*). Os suínos, ovinos, bovinos e várias espécies de roedores são inadequados como hospedeiros intermediários para esta linhagem. Evidências epidemiológicas sugerem que esta forma é infectante para os seres humanos com localização predominante de cistos nos pulmões e baixa patogenicidade (Eckert and Thompson, 1997). No entanto, tem sido relatado o ciclo doméstico envolvendo cães e renas domesticados em algumas partes do Canadá, Alasca, Sibéria, Finlândia, Noruega, Estónia, e Suécia (Rausch, 1995, Lavikainen et al. 2003, 2006, Thompson et al. 2006, Moks et al. 2008). *E. granulosus* de cervídeos difere em muitos aspectos de outras formas de *E. granulosus* (Thompson e Lymbery, 1988).

A linhagem ? (genótipo G9). - Na Polônia, estudos de análise de sequências de genes do DNA nuclear (espaçador interno transcrito do gene ribossômico - ITS1 ribossomal) e mitocondrial (ND1) de isolados de cisto de humanos de origem polonesa indicaram claramente que os pacientes não estavam infectados com a linhagem da ovelha comum (genótipo G1) de *E. granulosus* normalmente associados com equinococose cística humana nesta região. Em vez disso, a forma de *E. granulosus* que infectava os pacientes poloneses compartilhava sequências do gene ND1, com o reportado para a linhagem suína (G7), mas apresentaram algumas diferenças significativas. Esses isolados humanos foram propostos a compor um novo genótipo (designado G9) de *E. granulosus* (Scott et al. 1997). Os autores especularam que na Polônia os porcos naturalmente albergam o genótipo G9, entretanto os que ocorre em humanos, poderiam não se desenvolver adequadamente, produzindo cistos pequenos. Esta é uma importante questão epidemiológica que precisa ser melhor estudada (McManus, 2004).

A linhagem cervídea da Finlândia (genótipo G10). - Recentemente, foi encontrada uma nova linhagem de *E. granulosus* em cervídeos na parte norte-oriental da Finlândia, um genótipo distinto, que foi nomeado como a linhagem cervídea fenoscandian, genótipo G10 (Lavikainen et al. 2003). A caracterização original do genótipo G10 foi baseado em 4 isolados de renas

(*Rangifer tarandus tarandus*) e 1 alce (*Alces alces*) (Lavikainen et al. 2003). Recentemente o genótipo G10 também foi encontrado em isolados de lobos (*Canis lupus*) na Estônia (Moks et al. 2005). O genótipo G10 parece ser o único na vida selvagem do norte da Europa. Este fato foi comprovado pela descoberta do G10 na Suécia onde este mesmo genótipo pode ter sido o agente causador de casos humanos de EC (Lavikainen et al. 2006).

Uma linhagem lion, foi recentemente descrita por Hüttner et al. (2007) em isolados de grandes felinos em Uganda. Porém mais estudos de identificação genética e morfológica dos vermes adultos estão em andamento para confirmar a posição da espécie. A linhagem lion já tinha inicialmente sido descrita como *Echinococcus felidis* por Ortlepp (1937) para o felino *Panthera leo*, no Sul da África.

Tabela 1.1. Principais linhagens de *Echinococcus granulosus* e os genótipos mitocondriais correspondentes. Os hospedeiros definitivos e intermediários. Distribuição geográfica e referências principais (modificado de Thompson e McManus, 2002)

Linhagem/Genótipo	Hospedeiro definitivo conhecidos	Hospedeiro intermediário conhecidos	Distribuição geográfica provável	Referências principais
Ovelha comum (G1)	cão, raposa, dingó, chacal, hiena	ovelha, boi, cabra, búfalo, camelo, porco, macrópodes *homem	Austrália, Europa, Ásia, Nova Zelândia, África, Oriente Médio, América do Norte, América do Sul, Rússia Federal	Bowles et al. 1992; Bowles and McManus, 1993,
Ovelha de Tasmânia (G2)	cão, raposa	ovelha, *homem	Tasmânia, Argentina	Bowles et al. 1992; Bowles and McManus, 1993
Búfalo (G3)	cão, raposa	Búfalos, boi	Ásia	Bowles et al. 1992; Bowles and McManus, 1993
Equino (G4)	cão	cavalos e outros equinos	Europa, Oriente Médio, África do Sul	Bowles et al. 1992; Bowles and McManus, 1993
Bovino (G5)	cão	bovino, *homem	Europa, Índia, Sri-Lanka, América do sul, Rússia Federal, África do Sul	Bowles et al. 1992; Bowles and McManus, 1993
Camelo (G6)	cão	camelo, boi, cabra, *homem	África, China, Oriente Médio, Argentina	Bowles et al. 1992; Bowles and McManus, 1993
Suíno (G7)	cão	Porcos, javali, *homem	Europa, Rússia Federal, América do Sul	Bowles et al. 1992; Bowles and McManus, 1993
Cervídeo (G8)	lobo, cão	cervídeos *homem	América do Norte, Eurásia	Bowles et al. 1994
? G9	cão	homem	Polônia	Scott et al. 1997
Cervídeo (G10)	lobo, cão	cervídeos de Finlândia	Finlândia	Lavikainen et al. 2003

*Hospedeiro acidental

1.8. Principais linhagens de *E. granulosus* na América do Sul e Peru

Na América do Sul, análise molecular de isolados de *E. granulosus* tem mostrado a presença de várias linhagens, principalmente na Argentina, onde foram descritas cinco linhagens, a ovelha comum (genótipo G1), ovelha de Tasmânia (genótipo G2), bovina (genótipo G5), camelo (genótipo G6) e suína (genótipo G7) em isolados de rebanho, bovino, ovino e seres humanos (Rosenzvit et al. 1999, Kamenetzky et al. 2002). No Sul do Brasil, de La Rue et al. (2006) relatam a presença de duas linhagens, a ovelha comum (genótipo G1) e a bovina (genótipo G5) em isolados de rebanho bovinos e ovinos. No Chile, Manterola et al. (2008) identificam duas linhagens a ovelha comum (genótipo G1) e camelo (genótipo G6) em isolados de seres humanos. No Peru, estudos recentes indicam a presença das linhagens da ovelha comum (G1) em ovelha, boi e um caso da linhagem camelo (genótipo G6) em humano (Moro et al. 2009, Santivañez et al. 2008). Por outro lado a linhagem suína (genótipo G7) em porcos também foi identificada (Moro et al. 2009) na Cidade de Lima, uma região considerada de baixa endemicidade para echinococose cística, no Peru.

1.9. Filogenia de *Echinococcus granulosus*

A análise filogenética baseada nas sequências completas de 11 genomas mitocondriais mostra claramente a necessidade de reestruturar o status taxonômico das linhagens de *E. granulosus* (Nakao et al. 2007) (Fig. 1.6). Assim estes autores propõem que algumas clades principais dentro da filogenia de *E. granulosus* devem ser consideradas como espécies distintas. Os autores também sugerem a seguinte reclassificação: o grupo G1-G3 que inclui os três genótipos (G1, G2 e G3) deve ser considerado como espécie *E. granulosus stricto sensu*, G4 como espécie *E. equinus*, G5 como espécie *E. ortleppi* e G6-G10 (um grupo, incluindo os genótipos G6, G7, G8 e G10) como espécie *E. canadensis*.

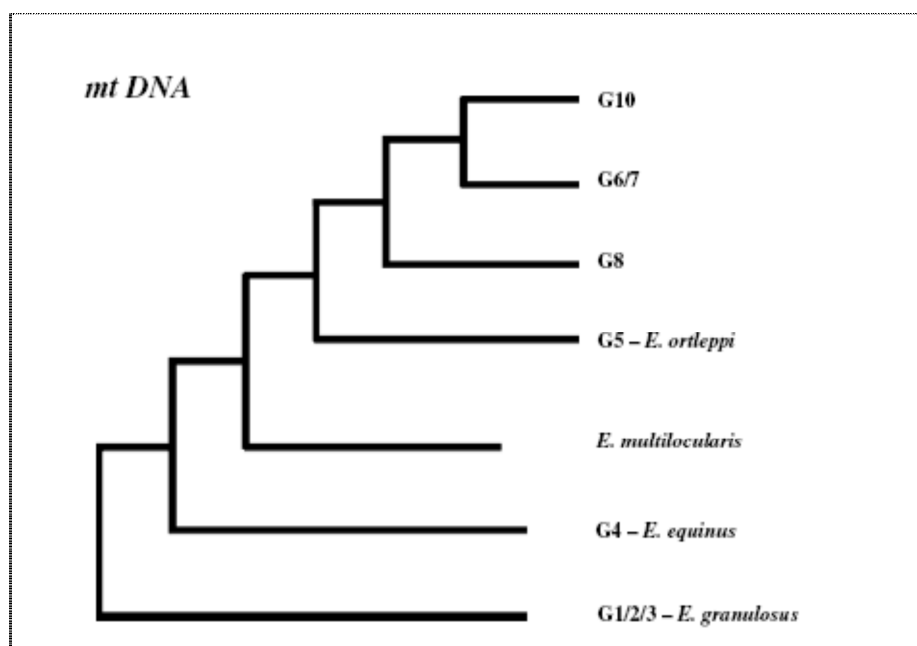


Figura. 1.6. Àrvore filogenética de algumas espécies de *Echinococcus* e genótipos baseados no genoma mitocondrial mtDNA (Thompson, 2008).

1.10. Técnicas moleculares para identificação de variantes

Os principais estudos moleculares para análise genética dentro do gênero *Echinococcus* foram realizados utilizando as técnicas como:

Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). - O uso desta técnica permitiu distinguir várias linhagens de *E. granulosus*. Neste caso o DNA é digerido por enzimas de restrição dando origem a fragmentos que podem ser separados por eletroforese em gel de agarose, sendo transferidos depois para uma membrana de nitrocelulose ou “nylon” e hibridizados com uma sonda específica de DNA previamente marcada (Bowles and McManus, 1993b, Eckert et al. 2001). Esta técnica mostrou ser rápida e ideal para a identificação de isolados e na investigação de padrões de transmissão do parasito, especialmente em regiões onde as variantes se distribuem de forma simpátrica (McManus, 2002).

Reação em cadeia da polimerase (PCR). - Durante a PCR, um fragmento de DNA, definido por iniciadores em cada extremidade, é amplificado vários milhões de vezes usando uma enzima

termoestável Taq polimerase. O advento da PCR tem proporcionado uma abordagem altamente sensível que agora é amplamente utilizado para fins de identificação de *Echinococcus* (McManus and Thompson, 2003).

PCR-RFLP. - O procedimento convencional de RFLP foi simplificado, sem perda de resolução ou precisão, ligando análise RFLP com PCR. Para tal foram usados genes nucleares como o ribossômico (rDNA) e seus espaçadores (ITS1) (Bowles and McManus, 1993a). Bandas característica de amplificação por PCR- ITS1 e PCR-RFLP ITS1 foram produzidos quando analisadas as amostras de *Echinococcus* e em cada grupo de linhagem. A abordagem mostrou ser rápida e, embora a sua utilidade tenha sido questionada (Kedra et al. 1999), esta técnica tem-se revelado aplicável e confiável nas mãos de muitos pesquisadores para a identificação de isolados de *E. granulosus* recém-coletados (Bowles & McManus, 1993a; Wachira et al. 1993; Bowles, Blair & McManus, 1994; Scott et al. 1997; Rosenzvit et al. 1999; Snabel et al. 2000; Gonzalez et al. 2002).

DNA Polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD-PCR). - Este é outro método que tem sido usado sob condições cuidadosamente controladas para distinguir as quatro reconhecidas espécies de *Echinococcus* (*E. multilocularis*, *E. oligarthrus*, *E.vogeli*, *E.granulosus*) e variantes geneticamente de *E. granulosus* (Eckert et al 1993, Scott and McManus, 1994, Siles-Lucas et al. 1994, Turcekova et al. 2003).

Polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP). - É uma técnica relativamente simples, tem uma alta capacidade de resolução em condições ótimas que permite a análise de muitos isolados e a identificação de alelos heterozigotos que geram estruturas secundárias em diferentes cadeias simples. Esta técnica foi utilizada na caracterização dos genótipos mitocondriais e aplicada também na identificação da variabilidade do DNA mitocondrial em populações da China e Argentina (Zhang et al. 1999). Porém, o mais interessante para estudos populacionais é a capacidade de discriminar alelos em heterozigose e homozigose como descrito por Haag et al. (1999). A abordagem também tem sido utilizada para avaliar a variabilidade genética de regiões codificantes e não-codificantes do genoma de *E. granulosus* e inferir que a autofecundação é o sistema de cruzamento prevalente em populações destes parasitos (Haag et al. 1999).

PCR- Sequenciamento de DNA - Comparação da sequência de nucleotídeos de segmentos definidos de DNA entre organismos fornece o meio mais direto e sensível de detecção de variação genética. O PCR fez uma abordagem viável de comparação de sequência para o estudo da variação genética. Sequências mitocondriais, particularmente fragmentos de genes mitocondriais codificadores dos genes CO1 (citocromo c oxidase subunidade 1 (CO1) (Bowles et al.1992) e ND1 (NADH desidrogenase 1 (Bowles and McManus, 1993a), tem se revelado de valor inestimável para identificação de linhagens de *E. granulosus*. O sequenciamento das regiões do DNA mitocondrial que codifica a CO1 e a ND1 ajudaram a identificar e caracterizar as 10 linhagens genotípicas (G1 a G10) de *E.granulosus* conhecidas até agora (Bowles et al. 1992, Bowles and McManus, 1993c, Scott et al. 1997, Lavikainen et al. 2003)

1.11. Principais marcadores moleculares

A variação genética em *E. granulosus* pode ser investigada tanto no genoma nuclear como no genoma mitocondrial. Aqui mencionamos os marcadores mais utilizados:

Marcadores nucleares:

O gene RNA ribossômico nuclear (rDNA).- tem sido amplamente utilizado para estudar a variação e filogenia de *Echinococcus* (Bowles et al. 1995; Kedra et al. 1999) em diferentes níveis taxonômicos.

O Espaçador transcrito interno 1, 2 (ITS1 e ITS2). - vários estudos têm mostrado que o sequenciamento das regiões do primeiro e segundo espaçador transcrito interno do DNA ribossomal (rDNA) são marcadores genéticos confiáveis para determinar a variação intra-específica em *Echinococcus*. (Bowles and McManus, 1993a, Thompson et al. 2006).

Marcadores mitocondriais: CO1 e ND1

DNA mitocondrial (mt DNA).- A detecção de espécies de *E. granulosus* baseado no DNA mitocondrial tem se mostrado uma excelente ferramenta para a análise das linhagem/variação genotípica do parasito, e da relação filogenética para a determinação taxonômica das espécies em

questão. O DNA mitocondrial é útil para a discriminação de organismos geneticamente relacionados, principalmente por possuir uma taxa de evolução relativamente rápida e por ser haplóide de herança exclusivamente materna não sofrendo recombinação, simplificando assim a análises. Portanto o sequenciamento das regiões codificantes dos genes mitocondriais citocromo *c* oxidase subunidade 1 (COI) e NADH desidrogenase 1 (NDI) tem sido empregado para a determinação das 10 linhagens genótípicas (G1-G10) de *E. granulosus* conhecidas atualmente (Bowles et al. 1992, Bowles and McManus, 1993c, Scott et al. 1997, Lavikainen et al. 2003) (Fig. 1.7).

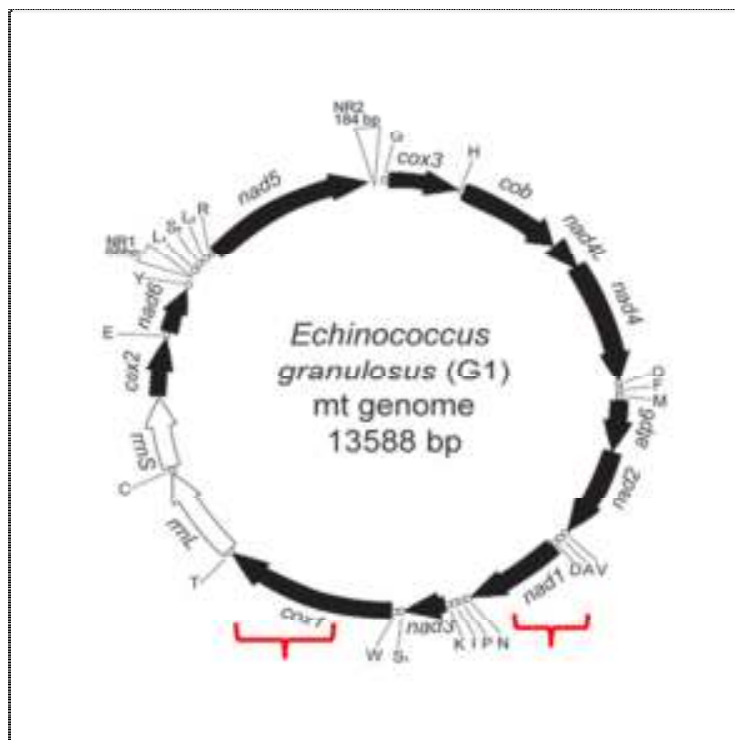


Figura 1.7. Representação esquemática do genoma mitocondrial circular de *Echinococcus granulosus*. A chave vermelha indica as regiões mais utilizadas para a caracterização das variantes genéticas de *E. granulosus*. (modificado de McManus, 2004)

Marcadores microsatélites. - Este marcador genético é a ferramenta mais utilizada no teste de paternidade e estudos forenses, pela capacidade de identificar os indivíduos. Esta característica faz dos microsatélites a principal escolha para estudos das relações evolutivas entre espécies e populações (Barker, 2002). Estudos realizados em *E. granulosus*, loci Egmsgal 1 e Egmsgal 2

mostraram que os isolados brasileiros do genótipo G5 e os isolados argentinos do genótipo G6 são monomórficos e compartilham o alelo (CA) 7. Assim mesmo os isolados de Argentina do genótipo G1 e G2 compartilham dois alelos [(CA) 8 e (CA) 10] com isolados brasileiros do genótipo G1 (Bartholomei-Santos et al. 2003).

1.1.2. Importância epidemiológica das variantes

A extensiva variação intra-específica em *E. granulosus* pode influenciar nos padrões do ciclo de vida, especificidade para o hospedeiro, tempo de desenvolvimento, dinâmica de transmissão, antigenicidade, sensibilidade a quimioterápicos e patologia do parasito (Thompson et al. 1995; Thompson and McManus, 2002). É também reconhecido que esta variabilidade tem importantes implicações no desenho e desenvolvimento de vacinas, testes de diagnóstico e drogas contra este parasito, com impacto sobre a epidemiologia e controle da equinococose (McManus and Bowles, 1996). Assim, Thompson (1995) mostrou que o parasito adulto da linhagem bovina de *E. granulosus* apresenta um desenvolvimento precoce no hospedeiro definitivo com um período pre-patente curto de apenas 33-35 dias, quase uma semana mais cedo do que o genótipo G1. Isto gera complicações nos esforços de controle onde o tratamento do hospedeiro definitivo com drogas é utilizado como um meio de interromper o ciclo de transmissão, uma vez que necessitaria um aumento na frequência de tratamento cestocidal no parasito adulto (McManus and Thompson, 2003). Observações feitas em algumas regiões do Quênia e Líbia mostraram a presença da linhagem ovelha comum (G1), virulenta para humanos. Por outro lado há evidências epidemiológicas de baixa ou nenhuma infectividade do genótipo G4 para os seres humanos (Thompson et al. 1995). Foi demonstrado também por estudos isoenzimáticos e moleculares e com base em dados epidemiológicos, que o genótipo G1 é altamente infectante para os seres humanos. Isso é confirmado devido ao fato de a maioria de material de *E. granulosus* obtido a partir de pacientes humanos pela cirurgia corresponderem ao genótipo G1. É de vital importância, portanto, considerar estas características diferenciais, observadas por muitos autores, para que as medidas de prevenção e controle da equinococose cística sejam realmente efetivas.

Em áreas endêmicas onde existem várias espécies de hospedeiros intermediários o reconhecimento da variação do genótipo é um pre-requisito importante para limitar esforços visados ao controle da transmissão da EC. No Peru, pelo menos 5 espécies de hospedeiros intermediários de *E. granulosus* estão presentes nas regiões endêmicas de EC, entre estes, a

ovelha, o boi, a cabra, o porco e a alpaca. Consideramos necessário e importante o conhecimento da(s) linhagem(s) que circula(m), nos diferentes hospedeiros intermediários do parasito, nas regiões endêmicas de EC no Peru. Os dados obtidos neste estudo ajudarão no desenho das medidas de prevenção e controle da EC nesse país. Nesse sentido ferramentas moleculares foram utilizados, para a identificação dos genótipos de *E. granulosus* circulantes em áreas endêmicas daquele país.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Determinar as variantes genéticas de *Echinococcus granulosus* circulantes nos diferentes hospedeiros intermediários nas distintas áreas endêmicas do Peru.

2.2. Objetivos específicos

- PCR-Sequenciamento dos fragmentos da região mitocondrial que codifica os genes citocromo C oxidase subunidade 1 (CO1) e NAHD deshidrogenase subunidade 1 (ND1) em isolados de cistos hidáticos de *E. granulosus*
- Determinar as variantes genéticas de *E. granulosus* nos diferentes hospedeiros intermediários
- Determinar a distribuição das variantes genéticas de *E. granulosus* circulantes nas diferentes regiões endêmicas da EC no Peru.
- Realizar a análise filogenética das variantes genéticas de *E. granulosus* presentes no Peru.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Áreas de estudo

A região andina do Peru encontra-se entre 2000 a 6000 metros de altitude. O clima é frio, com temperatura variando anualmente entre 6 e 14°C. As principais atividades econômicas da população desta região são a agricultura, pecuária e mineração. As regiões andinas dos departamentos de Puno, Junín, Cusco, Arequipa, Huancavelica e Ayacucho constituem os Andes centro-sul do Peru (Fig. 3.1).



Figura. 3.1. Mapa do Peru mostrando os locais onde foram coletados os isolados de *E. granulosus* para este estudo (desenho: Heloisa Nogueira – FIOCRUZ- Brasil)

Nas zonas onde crescem os pastos naturais prosperam os rebanhos ovino, bovino, caprino, alpacas entre outros. O cão rural, urbano e pastor destas regiões são os principais hospedeiros definitivos de tênia *Echinococcus*, oferecendo assim as condições necessárias para a difusão da

EC (Otarola, 1996). Estas regiões são consideradas de alta prevalência para EC em humanos e animais, motivo pelo qual foram selecionadas como áreas de estudo.

3.2. Coleta do material biológico

Os cistos hidáticos de *E. granulosus* foram coletados a partir de vísceras (fígado e/ou pulmões) de hospedeiros intermediários (ovelhas e bois) sacrificados nos matadouros oficiais da região Andina centro-sul do Peru. Um total de 99 cistos hidáticos foi coletado, 41 de ovelhas e 44 de bois (Fig. 3.2). Cistos hidáticos de 14 pacientes atendidos nos diferentes hospitais de Lima foram incluídos no estudo. Líquido hidático contendo protoescólice e/ou camada germinativa foram obtidos em condições assépticas (Fig. 3.3).



Figura. 3.2 Fígado e pulmão de hospedeiros intermediários infectados com cisto hidático (A, ovelha e B, boi)

(foto: Sánchez E, Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, INS, Lima-Peru)



Figura. 3.3. Obtenção de líquido do cisto hidático em condições assépticas
(foto: Sánchez E, Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, INS, Lima-Peru).

3.3. Exame microscópico dos cistos e morfometria dos ganchos rostelares

Para confirmar a presença de protoscólice e/ou camada germinativa no conteúdo dos cistos, exame por microscopia de luz foi realizado. Para determinar se os cistos hidáticos correspondiam a *E. granulosus*, procedeu-se a análise morfométrica dos ganchos rostelares, no Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria do Instituto Nacional de Salud, Lima - Peru. Um total de 2.000 ganchos rostelares, de 40 cistos férteis (50 ganchos por amostra) foi medido empregando ocular com escala micrométrica em microscópio de luz, com ocular 10x e objetiva de imersão.

3.4. Obtenção dos protoscólice e/ou camada germinativa de *Echinococcus granulosus*

Protoscólice e/ou camada germinativa obtidos de cada cisto hidático são chamados de isolados neste estudo. Os isolados foram lavados independentemente por três vezes com tampão fosfato salino (pH: 7.2), por centrifugação a 2.000 g por 15 min. O sedimento obtido foi mantido em etanol 95% a -20°C até a extração do DNA (Fig. 3.4). Na Tabela 3.1. é mostrada a origem geográfica e hospedeiros dos isolados de *E. granulosus*.

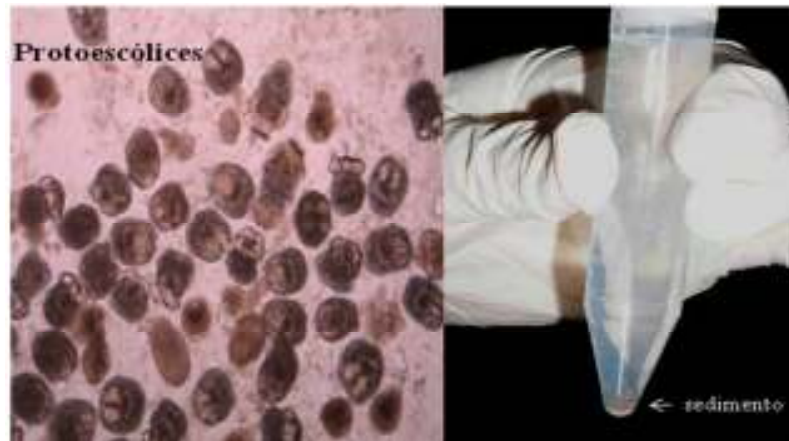


Figura. 3.4. Sedimento de líquido hidático contendo protoscólice e/ou camada germinativa (foto: Sánchez E, Laboratório de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, INS, Lima-Peru)

Tabela 3.1. Isolados de *Echinococcus granulosus* empregados no estudo. Origem geográfica e hospedeiro. Localização e fertilidade dos cistos hidático.

Nº Amostra	Origem geográfica	Hospedeiros	Localização do cisto hidático	Fertilidade do cisto hidático
1	Puno	boi	pulmões	Não
2	Puno	boi	fígado	Não
3	Puno	boi	pulmões	Não
4	Puno	boi	pulmões	Não
5	Puno	boi	pulmões	Não
6	Puno	boi	pulmões	Sim
7	Puno	boi	fígado	Sim
8	Puno	ovelha	pulmões	Não
9	Puno	ovelha	pulmões	Não
10	Puno	ovelha	pulmões	Sim
11	Puno	ovelha	fígado	Sim
12	Puno	ovelha	pulmões	Sim
13	Puno	ovelha	pulmões	Não
14	Puno	ovelha	pulmões	Sim
15	Puno	ovelha	pulmões	Sim
16	Junín	boi	pulmões	Não
17	Junín	boi	pulmões	Não
18	Junín	boi	pulmões	Não
19	Junín	boi	pulmões	Sim
20	Junín	boi	pulmões	Sim
21	Junín	boi	fígado	Sim
22	Junín	boi	pulmões	Não
23	Junín	boi	pulmões	Não
24	Junín	boi	pulmões	Não
25	Junín	boi	pulmões	Não
26	Junín	ovelha	fígado	Não
27	Junín	ovelha	pulmões	Não
28	Junín	ovelha	fígado	Sim
29	Junín	ovelha	pulmões	Sim
30	Junín	ovelha	pulmões	Sim
31	Junín	ovelha	pulmões	Sim
32	Junín	ovelha	fígado	Sim
33	Junín	ovelha	pulmões	Sim
34	Junín	ovelha	fígado	Sim

35	Junín	ovelha	fígado	Não
36	Junín	ovelha	fígado	Sim
37	Junín	ovelha	pulmões	Sim
38	Junín	ovelha	fígado	Sim
39	Junín	ovelha	fígado	Sim
40	Junín	ovelha	fígado	Sim
41	Junín	ovelha	pulmões	Sim
42	Junín	ovelha	pulmões	Sim
43	Junín	boi	pulmões	Não
44	Junín	ovelha	fígado	Sim
45	Cusco	boi	pulmões	Sim
46	Cusco	boi	pulmões	Não
47	Cusco	boi	pulmões	Sim
48	Cusco	boi	pulmões	Não
49	Cusco	boi	pulmões	Sim
50	Cusco	boi	pulmões	Não
51	Cusco	boi	fígado	Sim
52	Cusco	boi	pulmões	Não
53	Cusco	boi	pulmões	Sim
54	Arequipa	ovelha	fígado	Sim
55	Arequipa	ovelha	pulmões	Sim
56	Arequipa	boi	pulmões	Não
57	Arequipa	boi	pulmões	Não
58	Arequipa	boi	pulmões	Não
59	Arequipa	boi	fígado	Não
60	Arequipa	boi	pulmões	Não
61	Arequipa	boi	pulmões	Não
62	Arequipa	boi	pulmões	Não
63	Arequipa	boi	pulmões	Não
64	Arequipa	boi	pulmões	Não
65	Arequipa	boi	pulmões	Não
66	Arequipa	boi	pulmões	Não
67	Arequipa	boi	pulmões	Não
68	Huancavelica	boi	pulmões	Sim
69	Huancavelica	boi	pulmões	Não
70	Huancavelica	boi	pulmões	Não
71	Huancavelica	boi	pulmões	Não
72	Huancavelica	boi	fígado	Não
73	Huancavelica	ovelha	pulmões	Não
74	Ayacucho	ovelha	pulmões	Sim
75	Ayacucho	ovelha	fígado	Sim

76	Ayacucho	ovelha	pulmões	Sim
77	Ayacucho	ovelha	fígado	Sim
78	Ayacucho	ovelha	pulmões	Sim
79	Ayacucho	ovelha	pulmões	Sim
80	Ayacucho	ovelha	pulmões	Sim
81	Ayacucho	ovelha	fígado	Sim
82	Ayacucho	ovelha	fígado	Sim
83	Ayacucho	ovelha	fígado	Sim
84	Ayacucho	ovelha	pulmões	Sim
85	Ayacucho	ovelha	pulmões	Sim
86	Ayacucho	humano	pulmões	Sim
87	Ayacucho	humano	pulmões	Sim
88	Puno	humano	pulmões	Sim
89	Puno	humano	fígado	Sim
90	Puno	humano	pulmões	Sim
91	Puno	humano	pulmões	Sim
92	Puno	humano	pulmões	Sim
93	Puno	humano	pulmões	Não
94	Puno	humano	pulmões	Sim
95	Huancavelica	humano	pulmões	Sim
96	Huancavelica	humano	pulmões	Sim
97	Cusco	humano	pulmões	Sim
98	Arequipa	humano	pulmões	Sim
99	Puno	humano	pulmões	Sim

3.5. Análise molecular e filogenética

A análise molecular e filogenética dos isolados de *E. granulosus*, foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

3.5.1. Análise de genótipos pelo gene mitocondrial citocrome C oxidase subunidade 1 (CO1), está descrita no Artigo 1 publicado na Revista: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Artigo 1

Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene

Elizabeth Sánchez, Omar Cáceres, César Náquira, David García, Gladys Patiño, Herrera Silvia, Aline C Volotão, Octavio Fernandes

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 105(6): 806-810, September 2010

Objetivo: Determinar as variantes de *E. granulosus* nos hospedeiros intermediários das regiões endêmicas de EC no Peru, por PCR-Sequenciamento de um fragmento do gene mitocondrial citocromo C oxidase subunidade 1 (CO1).

Conclusão: Os resultados indicam a circulação de um só genótipo G1 (linhagem ovelha comum) nas regiões endêmicas de EC estudadas. Uma microvariantes G1⁴ também foi encontrado pela primera vez na America do Sul.

Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene

Elizabeth Sánchez^{1,3}*, Omar Cáceres¹, César Náquira¹, David García¹, Gladys Patiño², Herrera Silvia¹, Aline C Volotão³, Octavio Fernandes³

¹Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru ²Hospital Hipólito Unzué, Lima, Peru ³Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Echinococcus granulosus, the etiologic agent of cystic echinococcosis (CE) in humans and other animal species, is distributed worldwide. Ten intra-specific variants, or genotypes (G1-G10), have been defined based on genetic diversity. To determine the genotypes present in endemic areas of Peru, samples were collected from cattle (44), sheep (41) and humans (14) from Junín, Puno Huancavelica, Cuzco, Arequipa and Ayacucho. DNA was extracted from protozoal and/or germinal layers derived from 99 *E. granulosus* isolates and used as templates to amplify the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. The resulting polymerase chain reaction products were sequenced and further examined by sequence analysis. All isolates, independent of the host, exhibited the G1 genotype. Phylogenetic analysis showed that three isolates from Ayacucho shared the same cluster with microvariant G1⁴. The G1 genotype is considered the most widespread and infectious form of *E. granulosus* worldwide and our results confirm that the same patterns apply to this country. Therefore, these findings should be taken into consideration in developing prevention strategies and control programs for CE in Peru.

Key words: *Echinococcus granulosus* - cytochrome C oxidase subunit 1 - genotypes - Peru

Echinococcus granulosus (Batsch 1786) is a cestode, capable of infecting humans and several other animal species worldwide. The adult form resides mainly in dogs, however, the larval form (hydatid cyst) is found in a wide variety of mammals, including humans. The presence of cysts in an animal leads to cystic echinococcosis (CE). In humans, the disease is considered a critical public health problem. In addition to human health concerns, infections in cattle breeding areas result in economic losses (Thompson 2008). The disease is endemic in many South American countries, including Uruguay, Argentina, Chile, Brazil, Peru and Bolivia (Kamenetzky et al. 2002). The impact of CE on human health makes it one of the most important zoonotic diseases.

In Peru, CE is endemic mainly within the cattle producing areas in the central-southern regions of the country (Pérez 2007). The incidence of human cases of CE in Peru is approximately 7-11/100,000 (MS 2005), but it has been reported that in the regions of Junín, Puno, Huancavelica, Cuzco, Arequipa and Ayacucho, the incidence varies between 11-39/100,000. For animal cases in these areas, the prevalence varies from 1-75% (Pérez 2007) and is primarily associated with the circulation of the parasite between sheep and dogs (Náquira 1993).

As a species, *E. granulosus* comprises a number of intraspecific variants, strains or genotypes at the genetic level (Thompson & McManus 2001, McManus & Thompson 2003, Nakao et al. 2007, 2010). Currently, 10 distinct genotypes (G1-G10) have been described worldwide, based on nucleotide sequence analysis of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 (CO1) and NADH dehydrogenase 1 genes. These different genotypes have been associated with distinct, intermediate hosts: sheep, pigs, cattle, horses, camels, goats and cervids (Bowles et al. 1992, 1995, Bowles & McManus 1993a, b, c, Scott et al. 1997, Zhang et al. 1998, McManus 2002, Lavikainen et al. 2003, Busi et al. 2007, Moks et al. 2008).

In South America, molecular studies have demonstrated the presence of several variants of *E. granulosus*. In Argentina, G1 and G6 have been isolated from human, G2 from sheep and humans and G7 from pigs (Rosenzvit et al. 1999, Kamenetzky et al. 2002). In Chile, similar studies revealed G1 and G6 in human (Manterola et al. 2008). The G1 and G6 variant have been characterized from humans in Peru (Santivañez et al. 2008). The G1 genotype has also been isolated from sheep, cattle and goats in Peru. In addition, other variants were identified, including G7 from pigs and G6 from goats (Moro et al. 2009).

It has been suggested that the extensive, intra-specific genetic variation of *E. granulosus* may be better understood within the context of variations within the life cycle pattern (Thompson & McManus 2001). In addition, other biological consequences have been suggested to be linked to the different genotypes, such as rate of development, antigenicity, transmission profiles, sensitivity to chemotherapeutic agents and pathologic patterns (Thompson & Lymbery 1988, Thompson et al. 1995, Thompson & McManus 2001, 2002).

Financial support: CAPES (to ES)
* Corresponding author: esanchez@ioc.fiocruz.br
Received 25 February 2010
Accepted 28 July 2010

All of these aspects should be considered in developing vaccines, diagnostic tests and pharmacological therapies for CE. Therefore, due to epidemiological implications and for the design of control strategies, it is essential that circulating *E. granulosus* genotypes in a given endemic area are clearly defined (McManus & Bowles 1996, McManus & Thompson 2003). In this study, the molecular characterization of 99 *E. granulosus* isolates from humans and other animals was performed by sequence analysis of a fragment of the mitochondrial CO1 gene to define the circulating genetic variants in hyper-endemic areas of Peru.

MATERIALS AND METHODS

Study area - Hydatid cysts were collected from sacrificed animals (sheep and dairy cattle) in official abattoirs from high prevalence areas of CE in the mountain regions of Peru (Fig. 1). The areas are known as breeding zones for dairy cattle and sheep (intermediate hosts). Moreover shepherd dogs also live in this area and are definitive hosts for parasite. In addition, human isolates were collected from hydatid cysts from patients attending different hospitals in Lima. All the samples were parasitologically confirmed at the Parasitology National Reference Laboratory [National Institute of Health (NIH) Lima, Peru].

Samples collection - All hydatid cysts were obtained under aseptic conditions. Cyst contents were aspirated and examined under light microscopy to confirm the presence of protoscolex and/or germinal layers that were washed three times with phosphate buffered saline by centrifugation at 2,000 g for 15 min. The obtained pellets were kept at 95% ethanol at -20°C until DNA extraction.

DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) - *E. granulosus* genomic DNA was extracted from protoscolex and/or germinal layers using the QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN), following the manufacturer's instructions. DNA was stored at -20°C until used for PCR amplification. A region of 450 bp of the mitochondrial CO1 gene was amplified using the following primers: 5' TTTTITGGGCATCCTGAGGTTTAT 3' and 5' TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG 3' (Bowles et al. 1992). The reactions were carried out in a final volume of 50 µL containing approximately 50 ng of genomic DNA in the presence of appropriate buffer with 200 µM of each dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 50 pmol of each primer and 1.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen). The positive control was DNA from *E. granulosus* genotype G1 (kindly provided by Dr Mara Rosenzvit, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Argentina) and negative controls were DNA isolated from *Giardia duodenalis* trophozoites (reference strain WB) and water. PCR reactions were performed in all samples with positive and negative controls. The thermal profile of the PCR reaction was an initial 3 min at 95°C, followed by 35 cycles of 60 sec at 95°C, 60 sec at 56°C and 90 sec at 72°C, with a final incubation at 72°C for 3 min in a Gene Amp PCR System: 9700 (Applied Biosystems). The PCR products were analyzed with 1% agarose gel electrophoresis by ethidium bromide staining. An image of the gel was recorded under UV light using a gel documentation system (BioRad).



Fig. 1. geographic origin of *Echinococcus granulosus* isolates. A map of Peru displaying the regions in the country where samples were collected (gray regions). Inset shows location of Peru in relationship to all of South America.

Sequence analysis - PCR products were purified for sequencing using GFX PCR DNA Kit and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), following the manufacturer's instructions. The purified PCR products were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed by the genomic platform of DNA sequencing PD1S/Fiocruz in an automatic sequencer ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems), following the protocol described elsewhere (Otto et al. 2008). The chromatograms were analyzed and the nucleotide sequences obtained were aligned using the ClustalW method of the program MEGA 4.1 (megasoftware.net), using the sequences of the different genotypes of *E. granulosus* (G1, G2, G3, G4, G5, G6 and G7) and the microvariants of the G1 genotype (G1A, G1B, G1C, G1D, G1E and G1', G1'', G1''', G1'') deposited in the GenBank as references [accessions M84661/62/63/64/65/66/67 (Bowles et al. 1992), AF458871/72/73/74/75 (Kamenetzky et al. 2002) and EF393619, EF595654, EU178103, EU178104 (Vural et al. 2008)].

Phylogenetic analysis - Phylogenetic analyses were based on alignments obtained from ClustalW of a 375 bp sequence and carried out using MEGA v4.1. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining algorithm (Saitou & Nei 1987) with Kimura-2 parameters. To determine the robustness of the tree, Bootstrap analysis of 1,000 replicates was applied. A correspondent nucleotide sequence of *Taenia crassiceps* (GenBank accession AB03341) was used as an outgroup.

Ethical statement - This study was reviewed and approved by the Ethical Committee of NIH.

TABLE
Geographic and host origin of Peruvian isolates of *Echinococcus granulosus* and the fertility of the cysts

Geographic origin	<i>E. granulosus</i> G1						Total
	Sheep	Fertility		Cattle	Fertility		
		%			%		
Puno	8	62.5	7	28.6	3	100	18
Turin	18	83.3	11	27.3	5	80	34
Cusco	0	0	9	44	1	100	10
Arequipa	2	100	12	0	1	100	15
Huancavelica	1	0	5	20	2	100	8
Ayacucho ^a	12	100	0	0	2	100	14
Total	41	82.9	44	22.7	14	92.85	99

a: include G1^h microvariants of the G1 genotype.

RESULTS

Host and geographical origins of parasites - Samples of *E. granulosus* cysts were obtained from six cattle producing regions of southern Peru (Fig. 1). All samples collected from sheep and cattle were obtained from animals killed in abattoirs during a one-week period from each region. Isolates were prepared in the place collected to ensure proper designation of origin. Human isolates were collected from hydatid cysts of patients attending different hospitals in Lima for the treatment of the disease. The samples were subsequently sent for parasitological confirmation at the National Reference Laboratory, NIH. Every sample was examined by light microscopy to confirm the fertility of the cysts (presence of protoscolex). The Table lists the geographical and host origins of all the isolates collected for this study, as well as the fertility of the cysts.

Amplification of CO1 and sequence analysis - The CO1 gene of *E. granulosus* has been routinely utilized for variant designation, with specific primers identified for PCR amplification (Bowles et al. 1992). In our hands, these primers generated the expected 450 bp product after PCR amplification using all 99 isolates of *E. granulosus* as templates. Individual PCR products were further purified after gel electrophoresis and subjected to sequencing in duplicate.

The sequences obtained were initially analyzed by multiple alignments with reported reference sequences for the G1 genotype of *E. granulosus*. Ninety-six analyzed sequences were demonstrated to be 100% identical to the common sheep G1 genotype (Bowles et al. 1992). Three sequences isolated from Ayacucho exhibited a single nucleotide polymorphism, a thymine residue instead of a cytosine, generating a non-synonymous change in the corresponding amino acid sequence (A/V). These sequences were identical to the G1^h microvariant of the G1 genotype (Vural et al. 2008). Fig. 2 depicts a subset of sequences of the CO1 gene from the different isolates, compared to the G1 reference sequence. The obtained sequences were submitted to the GenBank database with the accession GU233854-GU233952.

Phylogenetic analysis - Phylogenetic analysis showed a robust tree clustering all samples as G1 genotype with a strong bootstrap (1,000 replicates). A particular group, composed of three sequences corresponding to G1^h microvariants, from a single geographic region is also depicted (Fig. 3). Bootstrap values are shown at relevant nodes. The evolutionary distance between the groups is very short, suggesting that the genetic divergence is recent.

DISCUSSION

An initial step in controlling the lifecycle of *E. granulosus* and minimizing infections is to determine the genotype. Peru has been reported to harbor a number of different *E. granulosus* genotypes. The presence of G6 and G7 genotypes was confirmed by partial sequence analysis of samples for the mitochondrial CO1 and nuclear elongation factor 1 alpha genes (Moro et al. 2009). The G7 genotype was identified in pigs from Lima, a city considered to be a low endemic area of *E. granulosus*. The same study reported the variant G6 in goats, as well as in one human case; nevertheless, this paper reported the predominance



Fig. 2: sequence alignment of cytochrome C oxidase subunit 1 (CO1) gene. Reference sequences for the CO1 gene for the genotype G1 variant are shown at the top with a random selection of isolate sequences beneath showing identity with the G1 sequence. The three isolates with a polymorphism (denoted by asterisk) show identity with the G1^h sequence.

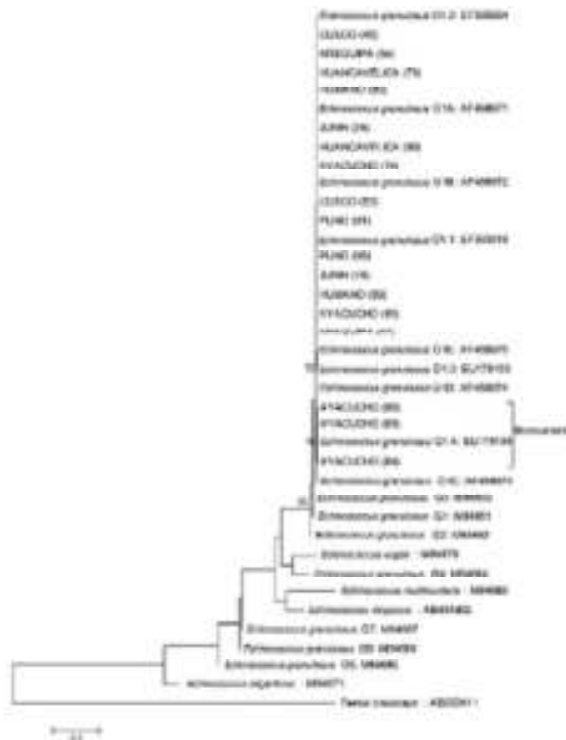


Fig. 3. Phylogenetic tree of representative sequences of *Echinococcus granulosus* from Peru and reference sequences of other genotypes. The tree was obtained by neighbor-joining analysis using partial sequences (375 bp) from cytochrome *c* oxidase subunit I gene (COI). All isolates cluster with sequences belonging to the common sheep G1 genotype variant. The three isolates from Ayacucho with the identical one nucleotide polymorphism cluster with the G1⁺ microvariant sequence (accession EU178104).

of the common sheep genotype (G1) in animal hosts and in four human cases in other studied areas of Peru. In this study, we confirmed the higher rate of fertility of G1 genotype cysts in sheep with respect to cattle.

The results presented here represent a more exhaustive sampling of cysts in cattle producing regions of Peru. Samples were obtained from cattle and sheep soon after slaughter, while human samples were collected from cysts sent to the National Reference Laboratory, NIH. Partial sequencing of the mitochondrial COI gene, amplified by PCR, showed the presence of only the G1 genotype among all 99 isolates studied. Similar results were reported by Santivañez et al. (2008) using the same molecular approach, showing the presence of G1 genotype in 21 human isolates from other endemic regions in Peru. G1 corresponds to the most common *E. granulosus* genotype found in sheep and humans worldwide.

In three of the samples from sheep in Ayacucho, a polymorphism was observed that corresponds to the G1⁺ microvariant. Previously, this microvariant had been described solely in Turkey (Vural et al. 2008).

The G1 genotype is the more common, infectious *E. granulosus* genotype in the world with a wide range of hosts (Craig et al. 2003). Our discovery of a single variant suggests that similar mechanisms are responsible for its persistence in the endemic areas studied. A major consideration stems from the observation that close relationships between dogs and humans appear to correlate with the high prevalence of the disease in these areas (Moro et al. 2009). In these poorer regions, dogs are often fed with livestock viscera, which may be infected with the parasite. This activity alone could be sufficient to propagate the current endemic state. In conclusion, our results indicate the prominent circulation of the common sheep genotype (G1) in hyper-endemic areas of Peru, taking into account the substantial number of samples analyzed per area. Moreover, this paper presents the first report of G1⁺ microvariants of the G1 genotype in South America.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the staff of the Regional Reference Laboratories of Puno, Junín, Cusco, Arequipa, Huancavelica and Ayacucho, Peru, for their help in samples collection, to Dr William Provance Jr, for the critical reading and English corrections of the manuscript, to Dr Mara Rosearvit, for providing the controls genotypes, to Dr Adelson Brandão, for their technical assistance, and to Heloísa Nogueira, for their help in designing the map.

REFERENCES

- Bowles J, Blair D, McManus DP 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54: 165-173.
- Bowles J, Blair D, McManus DP 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110: 317-328.
- Bowles J, McManus DP 1993a. NADH dehydrogenase I gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol* 23: 969-972.
- Bowles J, McManus DP 1993b. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol* 57: 231-239.
- Bowles J, McManus DP 1993c. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop* 33: 291-305.
- Busi M, Saabel V, Varcasia A, Garippa G, Perrone V, De Liberato C, D'Amelio S 2007. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Int Parasitol* 130: 75-83.
- Craig PS, Rogan MT, Campos-Ponce M 2003. *Echinococcosis*: disease, detection and transmission. *Parasitology* 127 (Suppl): S5-S20.
- Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, Garcia GE, Rosenzvit MC 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol* 2: 129-136.
- Levikainen A, Lehtinen MI, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127: 207-215.
- Mantelón C, Benavente F, Melo A, Vial M, Ros JC 2008. Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of southern Chile. *Parasitol Int* 57: 342-346.

- McManus DP 2003. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86 (Suppl. 1): S151-S157.
- McManus DP, Bowles J 1996. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int J Parasitol* 26: 687-704.
- McManus DP, Thompson RC 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127 (Suppl.): S37-S51.
- Mok S, Jęgisals I, Valdman H, Saarma U 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology* 133: 647-654.
- Moro PL, Nakao M, Ito A, Schantz PM, Cavers C, Cabrera L 2009. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitol Int* 58: 184-186.
- MS - Ministério de Salud 2005. *Oficina de estadística e informática. Informe Anual Estadística MINSA*. MS, Lima.
- Nakao M, Li T, Han X, Ma X, Xiao N, Qin J, Wang H, Yanagida T, Mamuti W, Wen H, Moro PL, Giraudoux P, Craig PS, Ito A 2010. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Int J Parasitol* 40: 379-385.
- Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134: 713-722.
- Náquira C 1993. Situación de la hidatidosis en el Perú. In *Memorias de la reunión del grupo científico sobre avances en la prevención, control y tratamiento de la hidatidosis*. Pan American Health Organization, Washington, p. 217-229.
- Otto TD, Vasconcelos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M 2008. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 7: 861-871.
- Pérez LCR 2007. *Proyecto de control de hidatidosis en el Perú por vigilancia epidemiológica*. PhD Thesis, Universidad Mayor de San Marcos, Lima, 132 pp.
- Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenszky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118: 523-530.
- Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Santivañez SJ, Gutiérrez AM, Rosenzvit MC, Muzlin PM, Rodríguez ML, Vasquez JC, Rodríguez S, González AE, Gilman RH, García HH. Cysticercosis Working Group in Peru 2008. Human hydatid disease in Peru is basically restricted to *Echinococcus granulosus* genotypes G1. *Am J Trop Med Hyg* 79: 89-92.
- Scott JC, Stefanik J, Pawlowski ZS, McManus DP 1997. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 114: 37-43.
- Thompson RC 2005. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol* 119: 439-446.
- Thompson RC, Lymbery AJ 1988. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 27: 209-258.
- Thompson RC, Lymbery AJ, Constantine CC 1995. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 33: 145-176.
- Thompson RC, McManus DP 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18: 432-457.
- Thompson RCA, McManus DP 2001. Aetiology: parasites and life cycles. In J Eckert, MA Gemmell, FX Meslin, ZS Pawlowski. *Manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern*. World Health Organization/World Organization for Animal Health, Paris, p. 1-9.
- Vural G, Batac AU, Ganci CG, Bağcı O, Gıcık Y, Lightowler MW 2008. Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome c oxidase I mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a reappraisal of the G1-3 genotype cluster. *Int Parasitol* 134: 347-350.
- Zhang L, Eslami A, Hosseini SH, McManus DP 1998. Indication of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. *Am J Trop Med Hyg* 59: 171-174.

3.5.2. Analise de genótipos pelo gene mitocondrial NAHD deshidrogenase subunidade 1 (ND1), está descrita no Manuscrito 1

Manuscrito 1: Short Report

Predominance of *Echinococcus granulosus* G1 genotype in cattle, sheep and humans from endemic regions of Peru assessed by NADH dehydrogenase subunit 1 gene analyze

Elizabeth Sánchez, Omar Cáceres, César Náquira, David Garcia, Gladys Patiño, Franklyn Samudio, Adeilton Brandão, Octavio Fernandes

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

Objetivo: Determinar as variantes de *E. granulosus* nos hospedeiros intermediários das regiões endêmicas de EC no Peru, por PCR-Sequenciamento de um fragmento do gene mitocondrial NAHD deshidrogenase subunidade 1 (ND1).

Conclusão: Os resultados confirmam a predominância do genótipo G1 (linhagem ovelha comum) em todos os isolados de boi, ovelha e humanos das regiões endêmicas do Peru. Em adição, um novo conjunto de iniciadores de PCR desenhados em base as regiões conservada do gene ND1 é proposto.

04-Aug-2011

Re: AJTMH-11-0506 Manuscript ID

Dear Dr. Elizabeth Sánchez:

This is to acknowledge that the above manuscript has been received by the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Please refer to this number in all your future correspondence with the Journal office.

Your user name is: esanchez@ioc.fiocruz.br

Your password may be found by using the password help function on the log-in page.

FOR ORIGINAL SUBMISSIONS:

This information refers to ORIGINAL SUBMISSIONS only. If this is a revised manuscript, please skip to the REVISIONS section of this letter below.

Please verify the following information and notify the journal office immediately if there are any discrepancies:

Manuscript type: Short Report

Title: Predominance of Echinococcus granulosus G1 genotype in cattle, sheep and humans from endemic regions of Peru assessed by NADH dehydrogenase subunit 1 gene analyze

Authors: Sánchez, Elizabeth; Cáceres, Omar; Náquira, César; García, David; Patiño, Gladys; Samudio, Franklyn; Brandão, Adeilton; Fernandes, Octavio

Number of tables: 1

Number of figures: 2

Word count: 1214

Right running head: Genotyping of E. granulosus from Peru

If you have not done so already, please be sure to download and sign the journal copyright form and return it to the journal office by fax or mail. This form can be accessed on the <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh> site under the "Instructions and Forms" link. We also require the signatures of all contributing authors on the cover letter indicating that they participated in the study and concur with the submission and subsequent revisions submitted by the corresponding author.

There are page charges for publication in the Journal. You will receive a separate e-mail from the journal office staff indicating your estimated page charges. Page charges do not apply to book reviews, CD reviews, Letters to the Editor, editorials, Images in Clinical Tropical Medicine and invited review articles. In addition, individual authors are usually not assessed page charges for articles that will appear in a supplement to the journal.

If you are not already a member of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH), now would be a good time to join. Members receive a subscription to the journal, a reduction in page charges, and access to a professional network of peers in the field of tropical medicine. For information on membership, please visit <http://www.astmh.org/JoinASTMH.htm>.

FOR REVISIONS:

Thank you for submitting your revised manuscript to the journal. The revised manuscript may need to go out for review again. We will keep you updated on its status.

Thank you for your interest in The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

Sincerely,

Laura Buckley

Laura Buckley
Editorial Assistant
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
ajtmh@hotmail.com

Running title:

Genotyping of *E. granulosus* from Peru

Title:

Predominance of *Echinococcus granulosus* G1 genotype in cattle, sheep and humans from endemic regions of Peru assessed by NADH dehydrogenase subunit 1 gene analyze

Authors names:

Elizabeth Sánchez, Omar Cáceres, César Náquira, David Garcia, Gladys Patiño, Franklyn Samudio, Adeilton Brandão, Octavio Fernandes

Institutional affiliations:

Laboratorio de Zoonosis Parasitaria, Biotecnología y Biología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru; Laboratorio de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru; Laboratorio de Patología, Hospital Hipólito Unanue, Lima, Peru; Laboratorio de Parasitología, Instituto Conmemorativo Gorgas de estudio de la salud, Panama; Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

*Corresponding author: esanchez@ioc.fiocruz.br (Elizabeth Sánchez)

Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. Tel: +55-21-25621420

Abstract:

Echinococcus granulosus is a cestode that is distributed worldwide. In its larval stage, it is responsible for cystic echinococcosis in humans and several animal species. This parasite shows great intraspecific variability, which is associated with distinct intermediate host. To define the genotype (s) associated to intermediates hosts in Peru, a partial sequence of the mitochondrial NADH dehydrogenase (ND1) gene was obtained from isolates of cattle (44), sheep (41) and humans (14). All isolates, regardless the host, belonged to the common sheep strain (G1 genotype) confirming that the G1 genotype is the predominant strain circulating in the endemic regions of Peru.

Key words: *Echinococcus granulosus*, NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1), Mitochondrial DNA Genotypes, Peru

Sponsorships: CAPES fellowship awarded to Elizabeth Sanchez

Echinococcus granulosus is a cestode whose larval stage is responsible for cystic echinococcosis (CE), an important zoonosis based on its impact to human health and domestic animals worldwide. This parasite has a life cycle within two different types of hosts with the adult form occurring in dogs, along with other canids, and the larval form (hydatid cyst) in non-canids, including humans. In Peru, CE is endemic mainly within the cattle producing areas of the central-southern regions of the country. The prevalence of CE in humans in these regions is one of the world highest ¹.

As a species, *E. granulosus* presents a high degree of intra-specific variations^{2, 3}. Molecular studies, using mainly mitochondrial DNA (mtDNA) sequences (cytochrome C oxidase subunit 1 and NADH dehydrogenase subunit 1 genes), confirm the variations and support the definition of 10 separate genotypes (G1 to G10) of *E. granulosus*^{4,5,6,7,8,9}.

In Peru, a previous study based on the sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 (CO1) gene identified the presence of only the G1 genotype (common sheep strain) in cattle, sheep and humans from CE endemic regions¹⁰. However, others genotypes were identified using the same genetic marker (CO1) and nuclear elongation factor 1 Alfa gene (ef1a) in other regions of Peru including the G6 genotype in human and goats, the G7 genotype in pigs and the G1 genotype in sheep, cattle, pigs, goats and humans^{11,12}.

The G1 genotype is generally considered to be the most widespread strain of *E. granulosus* genotypes worldwide. In addition, the G1 genotype is the most common strain involved in CE in humans and several animal species¹³. However, molecular epidemiological studies have confirmed that humans can also be infected by others *E. granulosus* genotypes different than G1¹⁴.

Partial sequences (471 bp fragment) of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) gene, have been successfully used for the identification of the *Echinococcus species* as well as for discriminate among the different strains and genetic variants of *Echinococcus granulosus*^{5,6}.

In this study, the NAHD dehydrogenase subunit 1 (ND1) region of the mitochondrial genome was analyzed in 99 *E. granulosus* larval isolates from cattle, sheep and humans to define the genotype (s) circulating in hyper-endemic regions of CE in Peru. Hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* were collected from 41 sheep and 44 cattle of EC endemic regions from Peru (Table 1). In addition, 14 human isolates were included in the study. Ethical approval

was obtained from Ethics Committee of the National Institute of Health, Lima, Peru. *Echinococcus* isolate was defined as protoscolex and/or germinal layer obtained from a single hydatid cyst.

PCR amplification was performed in a final volume of 50 µl containing approximately 25 ng of genomic DNA in the presence of the appropriate buffer with 200 µM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 10 pmol of each ND1 specific primer set (JB11/JB12 or EL1F/EL1R) and 1.5 units of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The positive control consisted of a known DNA sample from *E. granulosus* genotype G1 (kindly provided by Dr. Mara Rosenzvit, ANLIS-Argentina). The negative control was water. The thermal profile of the PCR reactions was an initial denaturation for 3 min at 95° C followed by 30 cycles of 30 sec at 95° C, 30 sec at 55° C and 45 sec at 72° C with a final incubation at 72° C for 7 min in a Gene Amp 9700 PCR Systems (Applied Biosystems).

A 550 bp region of the NADH dehydrogenase subunit (ND1) gene was amplified from 84 isolates using the primers JB11/ JB12 and the PCR conditions previously described ⁵. However, 15 isolates failed to yield PCR products using these primers. For the reason, new forward and reverse primers were designed based on a specific and conserved ND1 region from *E. granulosus*: EL1F (5' GTTTTTGGGTTAGTCTCTGG 3') and EL1R (5' ATCATAACGAACACGTGG 3'). All 99 samples generated 800 bp PCR products using the new primer set. No amplification was observed in the negative control.

The PCR products were purified and sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) by the genomic platform of DNA-sequencing PDTIS / FIOCRUZ in an automatic sequencer ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) following the protocol described elsewhere ¹⁵. Sequences obtained were aligned using the MEGA 5 software (<http://www.megasoftware.net>) and compared with sequences of *E. granulosus*

previously published in the international DNA databases (Gen Bank accession numbers: AJ237632 to AJ237638 (Bowles and McManus 1993) and AY386215).

Eighty-four analyzed sequences were 98% identical to the sequences of G1 genotype described by Bowles and McManus (1993). The other fifteen sequences were 100% identical to another group of sequences from G1 genotype described elsewhere¹⁶. Five major mutations were observed from comparisons of the sequences amplified by JB11/JB12 and EL1F/EL1R primers with known reference sequences of G1 genotype: (i) T→A at the 568 position, generating a non-synonymous change in the corresponding amino acid sequence (S/R), (ii) A→G at the 571 position and (iii) 573 position, (iv) T→C at the 576 position, and (v) T→G at the 583 position. These last four nucleotide substitutions were synonymous, thus no change was seen when evaluated the corresponding amino acid sequence by MEGA 5 (Fig. 1). The majority of samples with mutations were from sheep (40/41), cattle (31/44) and human (13/14). The obtained sequences were submitted to the GenBank database with the accession numbers: from JF946526 to JF946624.

A phylogenetic analysis was performed using Mega 5 software and a phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood algorithm with the Tamura-Nei distance¹⁷ as the evolutionary model. A single cluster was observed within the G1 genotype for ND1 gene (Fig. 2). This suggests that all organisms are phylogenetically related and belong to the same genotype (G1), even those that presented some variations in their nucleotide sequences. The nucleotide sequence of ND1 from *Taenia solium* (accessions: EF076753) was used as an outlier sequence.

In the present study, the existence of only 1 genotype (G1) of the *E. granulosus* in cattle, sheep and humans was demonstrated based on ND1 gene sequence. These results support the previous finding based on others molecular markers and suggest that G1 genotype might be the most predominant *E. granulosus* genotype in hyper-endemic regions from Peru^{10, 11, 12}.

The use of a new set of primers (EL1F/EL1R) to amplify a longer region of ND1 gene from *E. granulosus* proved capable of amplifying from all of the DNA samples. Using this new ND1 based strategy, we were able to amplify all the samples including those who presented some mutations in ND1 gene that kept them from aligning with previously reported primers ⁵. Five mutations were observed when compared all sequences produced with both JB11/JB12 and EL1F/EL1R primers with reference sequences of G1 genotype, evidenced the presence of two sub groups of G1 genotype. This finding suggests that the use of these sets of primer (JB11/JB12 and EL1F/EL1R) permits to discriminate the two sub-groups of G1 found in these endemic regions.

In conclusion, our results confirm the predominance of the G1 genotype based on partial sequences of the mitochondrial ND1 gene in all isolates of cattle, sheep and humans from endemic regions of Peru. In addition, a new primer set engineered from conserved regions of the ND1 gene is proposed for a more robust PCR-based approach for genotyping *E. granulosus*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to the staff of the Regional Reference Laboratories of Puno, Junín, Cusco, Arequipa, Huancavelica and Ayacucho, Peru, for their help in samples collection. We would also like to thank to D. William Provance, Jr. for the critical reading and English corrections of the manuscript, to Dr. Mara Rosenzvit for kindly provide the controls of the *E. granulosus* genotypes.

REFERENCES

1. Moro PL, McDonald J, Gilman RH, Silva B, Verastegui M, Malqui V, Lescano G, Falcon N, Montes G, Bazalar H, 1997. *Epidemiology of Echinococcus granulosus infection in the central Peruvian Andes. Bull World Health Organ 75: 553-61.*
2. Eckert J, Thompson RC, 1997. *Intraspecific variation of Echinococcus granulosus and related species with emphasis on their infectivity to humans. Acta Trop 64: 19-34.*
3. McManus DP, 2002. *The molecular epidemiology of Echinococcus granulosus and cystic hydatid disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 96 Suppl 1: S151-7.*
4. Bowles J, Blair D, McManus DP, 1992. *Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol 54: 165-73.*
5. Bowles J, McManus DP, 1993. *NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus Echinococcus. Int J Parasitol 23: 969-72.*
6. Bowles J, Blair D, McManus DP, 1994. *Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of Echinococcus granulosus. Parasitology 109 (Pt 2): 215-21.*
7. Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP, 1997. *Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of Echinococcus granulosus. Parasitology 114 (Pt 1): 37-43.*
8. Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S, 2003. *Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of Echinococcus granulosus. Parasitology 127: 207-15.*
9. Moks E, Jogisalu I, Valdmann H, Saarma U, 2008. *First report of Echinococcus granulosus G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. Parasitology 135: 647-54.*

10. Sanchez E, Caceres O, Naquira C, Garcia D, Patino G, Silvia H, Volotao AC, Fernandes O, 2010. *Molecular characterization of Echinococcus granulosus from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. Mem Inst Oswaldo Cruz 105: 806-10.*
11. Santivanez SJ, Gutierrez AM, Rosenzvit MC, Muzulin PM, Rodriguez ML, Vasquez JC, Rodriguez S, Gonzalez AE, Gilman RH, Garcia HH, 2008. *Human hydatid disease in Peru is basically restricted to Echinococcus granulosus genotype G1. Am J Trop Med Hyg 79: 89-92.*
12. Moro PL, Nakao M, Ito A, Schantz PM, Cavero C, Cabrera L, 2009. *Molecular identification of Echinococcus isolates from Peru. Parasitol Int 58: 184-6.*
13. Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Walz M, Zeyhle E, Elmahdi IE, Mackenstedt U, Romig T, 2004. *A PCR system for detection of species and genotypes of the Echinococcus granulosus-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. Int J Parasitol 34: 645-53.*
14. Thompson RC, 2008. *The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. Exp Parasitol 119: 439-46.*
15. Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraeve WM, Mendonca-Lima L, Alves-Ferreira M, 2008. *ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. Genet Mol Res 7: 861-71.*
16. Fernandez C, Gregory WF, Loke P, Maizels RM, 2002. *Full-length-enriched cDNA libraries from Echinococcus granulosus contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. Mol Biochem Parasitol 122: 171-80.*

17. *Tamura K, Nei M, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol 10: 512-26.*

Table 1Geographic and host origin of Peruvian isolates of *Echinococcus granulosus*

Geographic origin	Host			Total
	sheep	cattle	human	
Puno	8	7	3	18
Junín	18	11	5	34
Cusco	0	9	1	10
Arequipa	2	12	1	15
Huancavelica	1	5	2	8
Ayacucho	12	0	2	14
Total	41	44	14	99

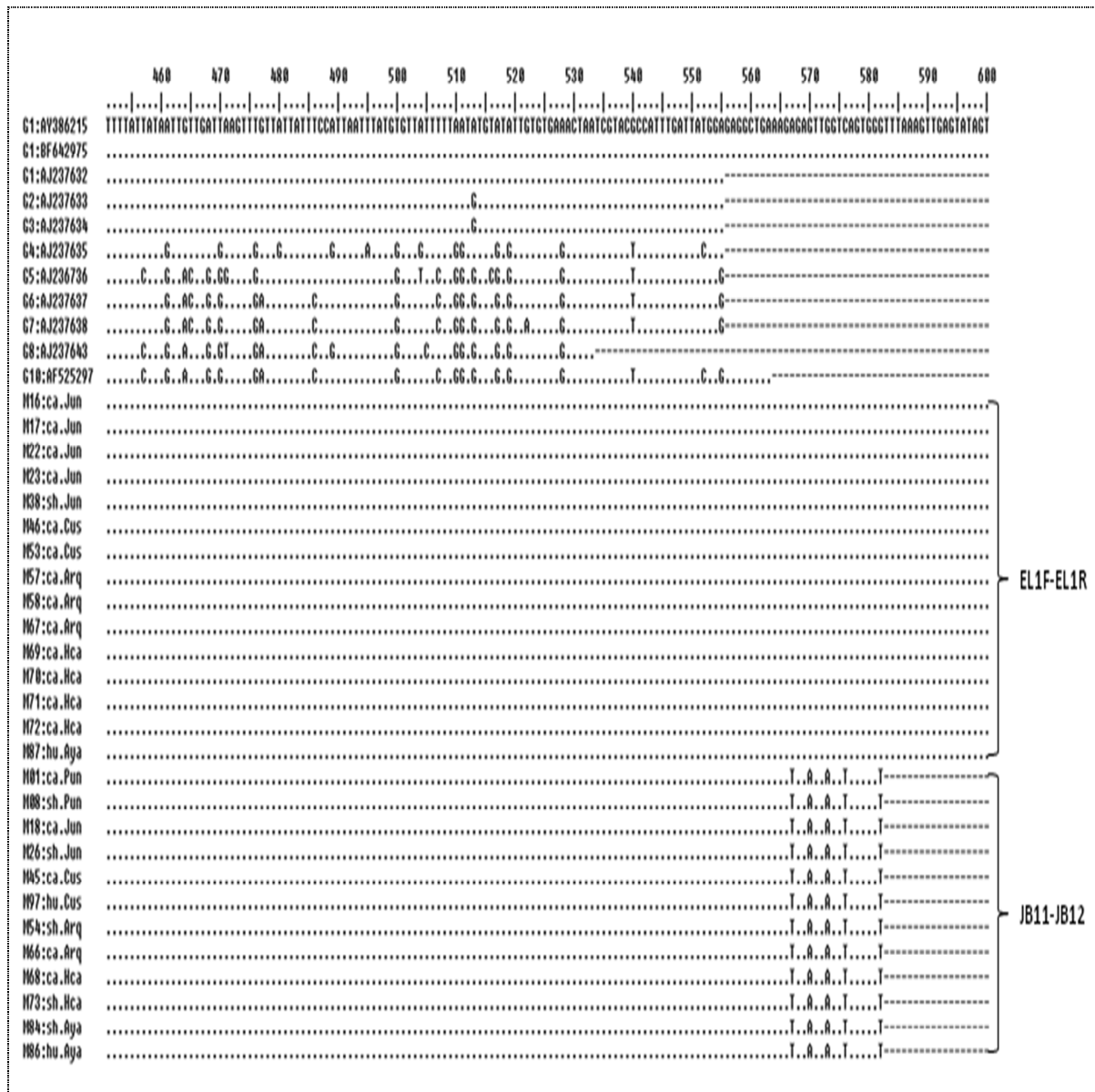


Fig.1. Comparison of the nucleotide sequences of fragments (757 bp and 483 bp) of the mitochondrial ND1 gene from 99 Peruvians isolates of *Echinococcus granulosus* with the published sequences GenBank, accession numbers: AY386215 and AJ237632 for the G1 genotype. Two subgroups de G1 genotype are showed in the study.

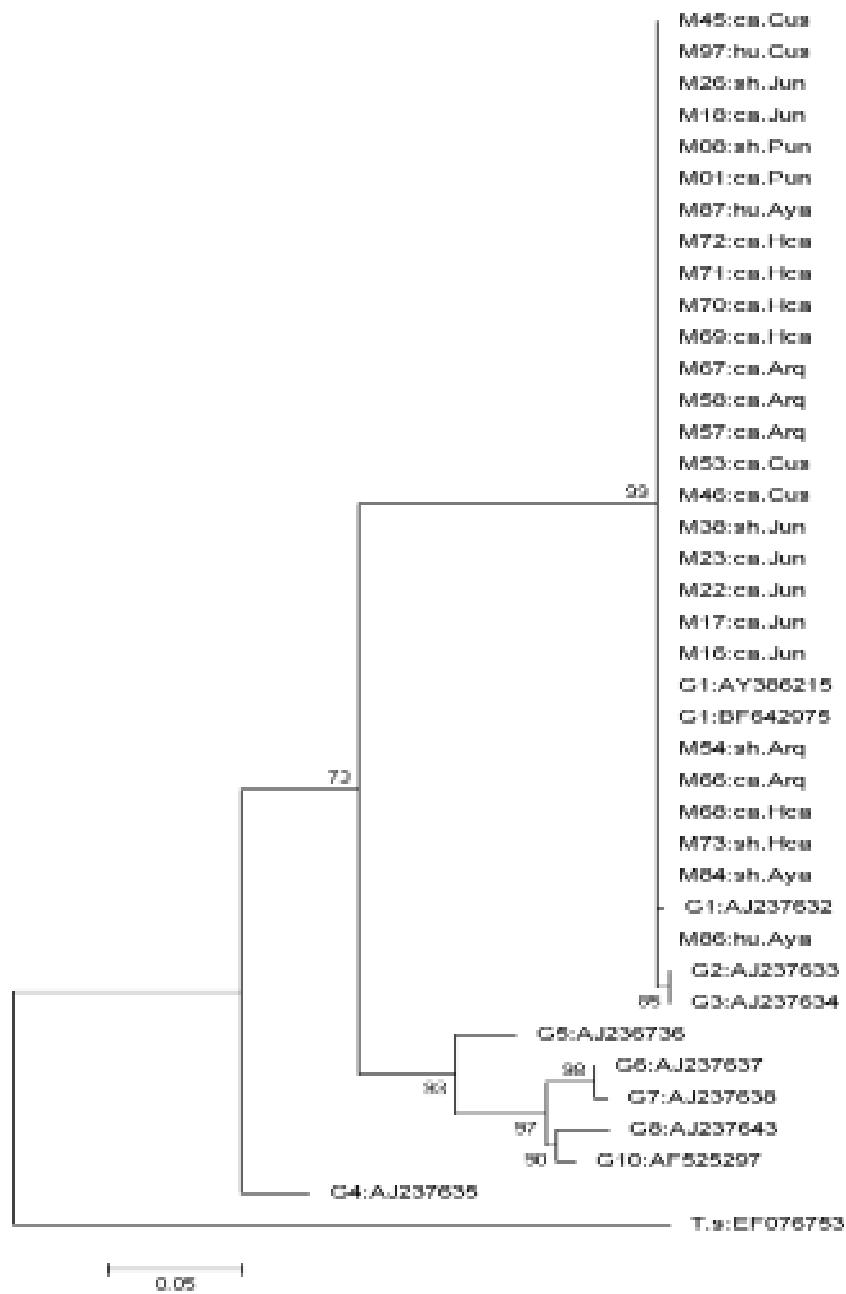


Fig.2. The Maximum Likelihood tree of Peruvian *Echinococcus granulosus* constructed by using partial DNA sequence of mitochondrial ND1 gene. All isolates cluster with sequence belonging to G1 genotype. The numbers at the nodes indicate percentage bootstrap support obtained from 1000 replications.

3.5.3. Analise de genótipos pelos genes mitocondriais CO1 e ND1 das amostras adicionais que correspondem a isolados de alpacas e porco estão descritos no Manuscrito 2:

Manuscrito 2

***Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpaca (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from endemic region of Peru**

Elizabeth Sánchez, Omar Cáceres, César Náquira, Eduardo Miranda, Franklyn Samudio, Octavio Fernandes

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

Objetivo: Determinar as variantes de *E. granulosus* circulantes em alpaca e porco das regiões endêmicas do Peru, por PCR-Sequenciamento de fragmentos dos genes mitocondriais CO1 e ND1.

Conclusão: Os resultados confirmam a presença do genótipo G1 (linhagem ovelha comum) em isolados de alpaca (Puno) e porco (Ayacucho). Adicionalmente, porcos podem ser infectados pelo genótipo G7 de *E. granulosus* em Ayacucho.

[MIOC] Submission Acknowledgement

—
15/06/2011

[Memorias do Instituto Oswaldo Cruz](#)

Para Elizabeth Sánchez

Dr.(a)Elizabeth Sánchez:

Manuscript: "Echinococcus granulosus genotypes circulating in alpaca (Lama pacos) and pigs (Sus scrofa) from endemic region of Peru"

Thank you for your above-mentioned manuscript which you kindly submitted for publication in the Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.

The manuscript will be sent to the Editorial Board for review. We will contact you again as soon as we receive the reviewer's comments.

With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:

<http://submission.scielo.br/index.php/mioc/author/submission/61408>

Username: bechita

Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Sincerely Yours,

Ricardo Lourenco de Oliveira
Editor

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz
<http://memorias.ioc.fiocruz.br>

Running title:

Genotyping of *E. granulosus* from Peru

Title:

Echinococcus granulosus genotypes circulating in alpaca (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from endemic region of Peru

Author's names:

Elizabeth Sánchez^{1, 4}, Omar Cáceres¹, César Náquira^{1,2}, Eduardo Miranda¹ Franklyn Samudio^{3,4}, Octavio Fernandes⁴

Intitutional affiliations:

1. Laboratórios de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, Biotecnología e Biología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru
2. Laboratório de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrion” Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru
3. Laboratório de Biología Molecualr, Instituto Conmemorativo Gorgas de estudio de la Salud, Panamá, Panamá
4. Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brasil

SUMMARY

Echinococcus granulosus, the cestode responsible for cystic echinococcosis (CE) in human and other animal species, can be found worldwide. Identification of genotypes in livestock and animal species are epidemiologically important because the different biological characteristics of individual strains can influence the local transmission cycle of CE contributing to the understanding of outbreaks. In this study, we analyzed 12 isolates from intermediate hosts of *E. granulosus*, 4 from alpaca and 8 from pigs, from endemic regions of Peru. PCR amplification and sequencing of specific regions from the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1(CO1) and NADH dehydrogenase subunit 1(ND1) genes were performed to determine the genotypes present in the samples. Molecular analysis showed that the single strain common to sheep, the G1 genotype, was present in alpaca. Two different strains of *E. granulosus* were identified in pigs; the G1 genotype, and the G7 genotype, previously described in these hosts. These findings contribute to the understanding of different reservoirs of *E. granulosus* strains in domestic animals, important for the control of this zoonosis in Peru.

Keywords: *Echinococcus granulosus*: mitochondrial genes: Genotypes: Peru

Sponsorships: CAPES fellowship to Elizabeth Sanchez

INTRODUCTION

The metacestode of the tapeworm *Echinococcus granulosus* responsible for cystic echinococcosis (CE) is present in humans and several animal species worldwide. In Peru, CE is endemic mainly within the cattle producing areas in the central-southern regions of the country. The prevalence of CE in humans is one of the highest in the world (Moro et al. 1997). For animal cases, the prevalence can reach up 75% (Perez, 2007).

The lifecycle of the *E. granulosus* includes dogs and other canids, which are definitive hosts of the adult parasite, while sheep and numerous ungulates (goat, cattle and pig) are intermediated hosts, harbouring the hydatid cyst (WHO/OIE, 2001). This larval form proliferates asexually and develops numerous protoscolices, each one with a potential to mature into an adult worm. The adult worms are hermaphrodites and reproduce mainly by self-fertilization in the carnivore intestine, but a low rate of outcrossing has been inferred after the finding of genetic polymorphisms (Lymbery et al. 1997).

Echinococcus granulosus displays a great intraspecific variation in relation to host (Thompson and McManus, 2002). Molecular genotyping using mitochondrial DNA (mtDNA) gene, have identified 10 distinct genetic variants or strains (G1-G10) within *E. granulosus*. These different genotypes have been associated with distinct intermediate host (Bowles et al. 1992, Bowles and McManus, 1993c, Kedra et al. 2000, Lavikainen et al. 2003, Obwaller et al. 2004, Badaraco et al. 2008, Moks et al. 2008, Schneider et al. 2010).

A previous study in Peru demonstrated the predominance of the G1 genotype, the strain common to sheep, in 21 human cases of the CE with one incidence of the G6 genotype (Santivañez et al. 2008). The G1 genotype was also identified as the only genotype present in cystics from cattle, sheep and humans from endemic regions in Peru (Sanchez et al. 2010).

However, the G6 genotype (camel strain) in human and goats, G7 genotype in pigs, and G1 genotype in sheep, cattle, pigs, goats and humans have been reported (Moro et al. 2009), in another endemic region of Peru. The G7 pig strain was detected in cases of CE from the less endemic area of Lima, Peru (Moro et al. 2009).

The G7 genotype differs morphologically, developmentally with regards to maturation rate, epidemiologically and genetically from others of *E. granulosus* strain (Eckert et al. 1993, Bowles and McManus, 1993c). The presence of this strain has been previously described in pigs and humans from Europe, Russia, South America and Mexico (Kedra et al. 2000, Turcekova et al. 2003, Varcasia et al. 2006, Haag et al. 2004, Villalobos et al. 2007).

The genetic characterization of *E. granulosus* populations in endemic regions is crucial to understanding the transmission patterns of the parasite between definitive hosts and humans/intermediate mammalian hosts, due to important epidemiological implications for the design of control strategies. Differences in the hosts and developmental patterns of the different genotypes should be considered when determining the allocation of resources necessary to contain outbreaks of CE.

In this study, the molecular identification of 12 *E. granulosus* isolates from animals was performed by analyzing both the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 (CO1) and NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) genes to define the genetic variants of *E. granulosus* circulating in alpaca and pigs, two economically important animals.

MATERIALS AND METHODS

Parasite isolates

Hydatid cysts were collected from alpaca (4) and pig (8) that originated from endemic regions (Puno and Ayacucho) of Peru (Table 1) and slaughtered in the abattoirs. Protoscolex and/or germinal layers were collected under aseptic conditions, washed with phosphate buffered saline (PBS) and stored in 95% ethanol at -20° C until processed for molecular analysis.

Molecular analysis

DNA was isolated from stored samples using the QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. Fragments of cytochrome C oxidase subunit 1 (*COI*) and NADH dehydrogenase subunit 1 (*ND1*) genes were PCR-amplified (Taq polymerase Invitrogen). A partial region of the *COI* was amplified following a previously described protocol (Sanchez et al. 2010). The *ND1* region was amplified using the following primers: EL1F: 5' GTTTTTGGGTTAGTCTCTGG 3' and EL1R: 5' ATCATAACGAACACGTGG 3'. Briefly, 20 ng of DNA from *E. granulosus* was used in both reactions. The thermal profile of the PCR was: denaturation for 3 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C and 45 sec at 72°C with final incubation at 72°C for 7 min in a Gene Amp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems). The PCR products were purified and sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed by the genomic platform of DNA-sequencing PDTIS/FIOCRUZ in an automatic sequencer ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) following the protocol described elsewhere (Otto et al. 2008). Nucleotide sequence

analysis was performed using BLAST algorithms and databases from the National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The sequences were analyzed using the software MEGA5 (<http://www.megasoftware.net>) and compared with the CO1 and ND1 reference sequences of the genotypes of *E. granulosus* present in GenBank.

Phylogenetic analysis

The Phylogenetic analysis was performed using Mega 5 software and a phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood algorithm with Tamura-Nei distance (Tamura and Nei, 1993) as evolutive model. To determine the robustness of the tree, Bootstrap analysis of 1000 replicates was performed. The nucleotide sequences of CO1 and ND1 from *Taenia solium* (accessions: EF076752 and AB033408 from CO1; EF076753 and CN_004022 from ND1) were used as outlier sequences.

RESULTS

Twelve samples of *E. granulosus* cystic were obtained from two endemic regions of southern Peru and consisted of 4 from alpaca and 8 from pigs. The geographical and host origins of all isolates collected for this study, as well as the fertility of the cysts, are shown in Table 1. DNA samples from all 12 isolates de *E. granulosus* were used as templates to amplify both CO1 and ND1 genes by PCR. The primers used generated products of approximately 450 bp and 800 bp for CO1 and ND1, respectively. Individual PCRs were performed in duplicate and each used to purify products and for sequencing. Partial sequences from the CO1 (399 bp) and ND1 (756 bp) genes were obtained and compared with reported reference sequences in the GenBank database of genotypes for *E. granulosus* (Fig. 1).

The analyses of these two mitochondrial marker genes for the *E granulosus* isolates confirmed the existence of the two distinct genotypes, G1 and G7. All isolates from alpacas and four from pigs showed identity with the common sheep strain, the G1 genotype (accessions: U50464 and M84661) and (accessions: GU233854 and GU233945). The other isolates from pigs were determined to present the G7 genotype (accessions AB458678 and M84667). In addition, the CO1 sequence of one alpaca isolate and three pig isolates showed 100% identity with same reference sequences of the G1 genotype (accessions U50646, GU233854 and GU233945). Other isolates (3 from alpaca and 1 from pig) showed 100% identity with a different reference strain (accessions M84661). These G1 reference sequences, and isolates, exhibit a single nucleotide polymorphism at the 57th position (T→C, numbering based on Figure 1). The obtained sequences were submitted to the GenBank database with the accession numbers: JF828330 to JF828341 for CO1 gene and JF828342 to JF828353 for ND1 gene.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis of sequences obtained showed two major clades. One larger clade included 8 sequences grouped within G1 genotype and the other clustered with G7 genotype four (Fig. 2) for both CO1 and ND1 genes. In addition, the clade grouping G1 genotypes showed two subgroups: four sequences grouped with G1 genotype (accession: U50646, GU233854 and GU233845) and other four sequence group by G1 genotype (accession M84661). Sequences of G1 genotype evaluated in an earlier study in Peru (GU233854 and GU233845) are included to show a best distribution of the Peruvian genotypes.

DISCUSSION

The results obtained in this study indicate that two genotypes of *E. granulosus* circulate within endemic regions of southern Peru; the G1 genotype in alpaca from Puno and both the G1 and G7 genotypes in pigs from Ayacucho. The results indicate the presence of two different cycles of transmission. For the G1 strain, the cycle includes alpaca, sheep, pigs and dogs, while the G7 strain includes pigs and dogs in this endemic region.

All of the hydatid cysts collected from alpaca were fertile. In pigs, hydatid cysts were isolated from both the liver and lungs. All of the cysts from the lungs were fertile, but only half of the cysts from liver were fertile. In this study, we report the higher rate of fertility of G1 and G7 genotypes cysts in alpaca and pigs. The alpaca (*Lama pacos*) is a grazing animal of the camelid family that are native of the Peruvian Andes region and others South-American countries. The fiber obtained from the alpaca is the main product of this animal and having textile characteristics highly prized. The high percentage of fertility of alpaca cysts suggests a high risk of infection for humans and animals by EC in these regions.

The G1 genotype is the most common strain identified from humans cases and animals worldwide. In Peru, previous studies showed a predominance of the G1 genotype (sheep common strain) in humans cases and hydatid cysts from sheep, cattle, goats and pigs in endemic region (Santivañez et al. 2008, Moro et al. 2009, Sanchez et al. 2010). The G6 genotype (camel strain) also was reported in human and goats (Santivañez et al. 2008, Moro et al. 2009). However, the G7 genotype (pig strain) has been identified in pigs from Lima, a city considered to be a low endemic area of *E. granulosus* (Moro et al. 2009). The present study supplements these findings by examining isolates from pigs collected from Ayacucho, an endemic region for CE in Peru.

The G1 genotype and the G7 genotype were identified in isolates from pigs, similar to results reported previously (Moro et al. 2009). These findings show that pigs can be infected by G1 genotype or G7 genotype in the region studied, confirming that pigs can be infected by multiple genotypes of *E. granulosus* (Eckert et al. 1993).

The G7 genotype differs morphologically, developmentally, epidemiologically and genetically from others *E. granulosus* strains (Eckert and Thompson, 1997). The shorter maturation time in dogs has considerable implications for hydatid control programs and for epidemiological studies. The G7 genotype has been previously described in human isolates from Slovakia (Tucekova et al. 2003), in pig isolates from Spain (Gonzalez et al. 2002), Austria (Schneider et al. 2010), Argentina (Rosenzvit et al. 1999), and Chile (Manterola et al. 2009). In Peru, no reports described hitherto the presence of genotype G7 in CE human.

Partial sequencing of the mitochondrial CO1 and ND1 genes amplified by PCR also showed the presence of only the G1 genotype (common sheep strain) among all isolates from the alpaca studied. This is the first time that G1 genotype of *E. granulosus* was discovered in alpaca from endemic regions of Peru.

Alignment of the sequences analysed from the CO1 gene and compared with reported references sequence in the GenBank for G1 genotype, showed a single nucleotide mutation causing two subgroups of G1 genotypes in the phylogenetic tree. This shows that in the endemic regions of Peru are present the two groups of G1 genotype.

In conclusion, our results indicate that more than one strain of *E. granulosus* circulates among the intermediate hosts of this parasite in endemic regions of Peru. It was also shown that pigs can be infected by both the G1 and the G7 genotype. Complementary studies will have to be performed to demonstrate the role of the pig strain in human disease in Peru. This knowledge will have important implications for the prevention and control of this zoonosis in Peru.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to Blgo. Herbet Larry of the Regional Laboratory of Puno, for their help in samples collection, to Dr. Adeilton Brandão for their technical assistance. We would also like to thank to D. William Provance, Jr. for the critical reading and English corrections of the manuscript, and to Heloísa Nogueira, for their help in designing the figures.

REFERENCES

- Badaraco JL, Ayala FJ, Bart JM, Gottstein B, Haag KL 2008. Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. *Exp Parasitol* 119: 453-459.
- Bowles J, Blair D, McManus DP 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54: 65–174.
- Bowles J, McManus DP 1993c. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol* 23: 969–972.
- Eckert J, Thompson RCA 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop* 64: 19-34.
- Eckert J, Thompson RCA, Lymbery A, Pawlowski Z, Gottstein B, Morgan UM 1993. Further evidence for the occurrence of a distant strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. *Parasitol Res* 79: 42-48.
- González LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC, McManus DP, Gárate T, Cuesta-Bandera C 2002. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol* 102: 46-56.

- Haag KL, Ayala FJ, Kamenetzky L, Gutierrez AM, Rosenzvit M 2004. Livestock trade history, geography, and parasite strains: the mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *J Parasitol* 90 (2): 234-239.
- Kedra AH, Tkach VV, Swiderski Z, Pawlowski Z, Emets A, Pawlowski J 2000. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from a wild boar. *Acta Parasitol* 45 (2): 121-122.
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127: 207-215.
- Lymbery AJ, Constantine CC, Thompson RCA 1997. Self-fertilization without genomic or population structuring in a parasitic tapeworm. *Evolution* 51: 289-294.
- Manterola C, Benavente F, Melo A, Vial M, Roa JC 2008. Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of Southern Chile. *Parasitol Int* 57: 342-346.
- Moro PL, McDonald J, Gilman RH, Silva B, Verastegui M, Malqui V, Lescano G, Falcon N, Montes G, Bazalar H 1997. Epidemiology of *Echinococcus granulosus* infection in the central Peruvian Andes. *Bull World Health Organ* 75 (6): 553 – 561.
- Moro P L, Nakao M, Ito A, Shantz PM, Cavero C, Cabrera L 2009. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitol Int* 58: 184-186.
- Moks E, Jogisalu I, Valdmann H, Saarma U 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology* 135: 647-654.
- Obwaller A, Schneider R, Walochnik J, Gollackner B, Deutz A, Janitschke K, Aspöck H, Auer H 2004. *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in

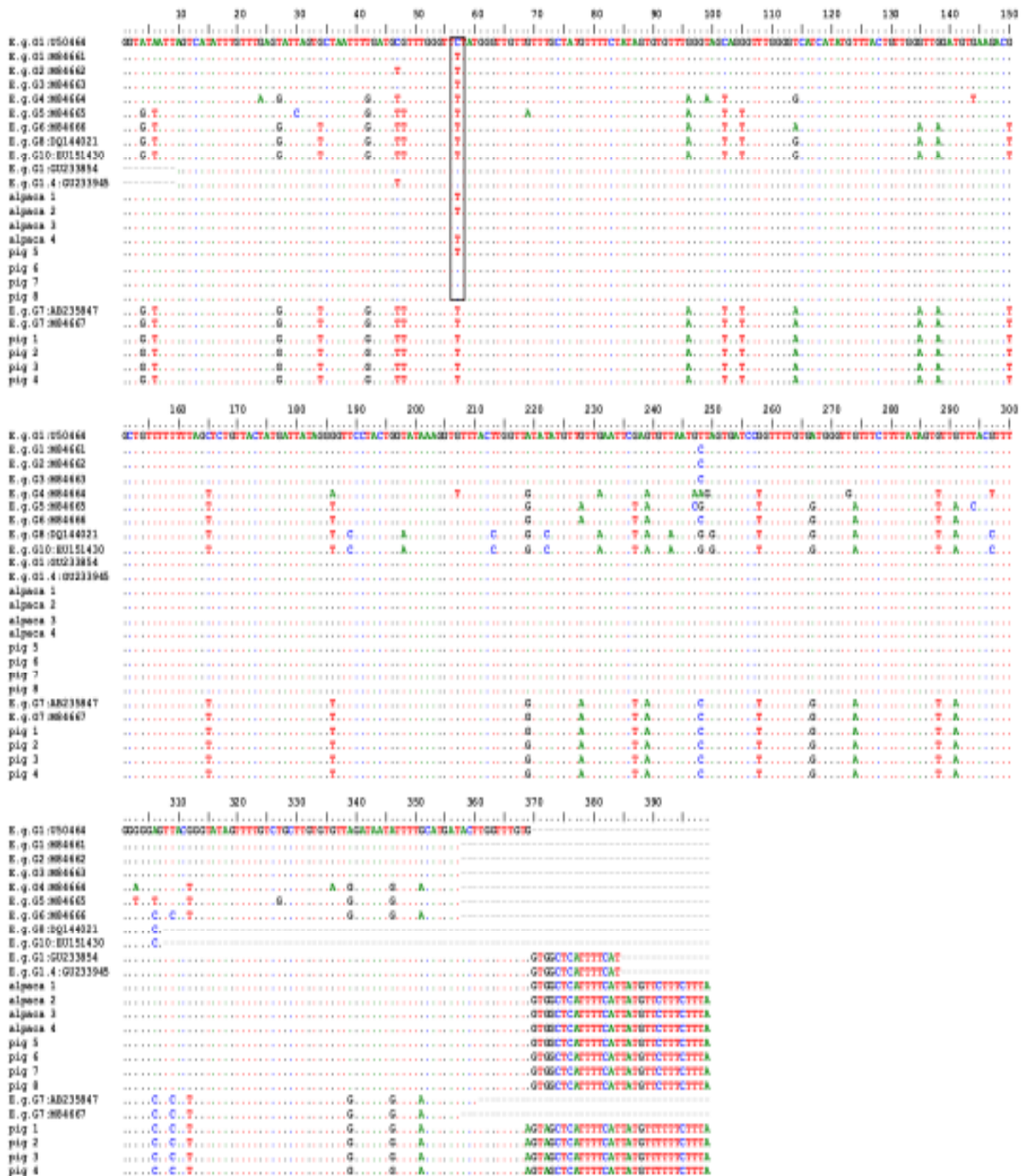
- mitochondrial genes of cytochrome *c* oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology* 128: 569-575.
- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M 2008. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 7: 861-871.
- Pérez LCR 2007. *Proyecto de Control de hidatidosis en el Perú por vigilancia epidemiológica*. PhD Thesis, Universidad Mayor de San Marcos, Lima Perú, p 132.
- Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118: 523-530.
- Sánchez E, Cáceres O, Náquira C, García D, Patiño G, Herrera S, Volotão AC, Fernandes O 2010. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105 (6): 806-810.
- Santivañes SJ, Gutierrez AM, Rosenzvit MC, Muzulin PM, Rodriguez ML, Vasquez, JC, Rodriguez S, Gonzalez AE, Gilman RH, Garcia HH, The Cysticercosis Working Group in Peru 2008. Human Hydatid Disease in Peru is Basically Restricted to *Echinococcus granulosus* Genotypes G1. *Am J Med Hyg* 79: 89-92.
- Schneider R, Gollackner B, Schindl M, Tucek G, Auer H 2010. *Echinococcus Canadensis* G7 (Pig Strain): An Underestimated Cause of Cystic Echinococcosis in Austria. *Am J Med Hyg* 82 (5): 871-874.
- Tamura K, Nei M 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of the mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512-526.

- Thompson RCA, McManus DP 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18: 452-457.
- Turceková L, Snábel V, D'Amelio S, Busi M, Dubinský P 2003. Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Trop* 85: 223-229.
- Varcasia A, Canu S, Lightowlers MW, Scala A, Garippa G 2006. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strain in Sardinia. *Parasitol Res* 98: 273-277.
- Villalobos N, González LM, Morales J, Aluja AS, Jiménez MI, Blanco MA, Harrison LJS, Parkhouse RME, Gárate T 2007. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. *Vet Parasitol* 147: 185-189.
- WHO/OIE 2001. Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern (ed. Eckert J, Gemmell M.A, Meslin FX, Pawłowski ZS), pp. 1-9. World Health Organization/World Organization for animal Health: Paris.

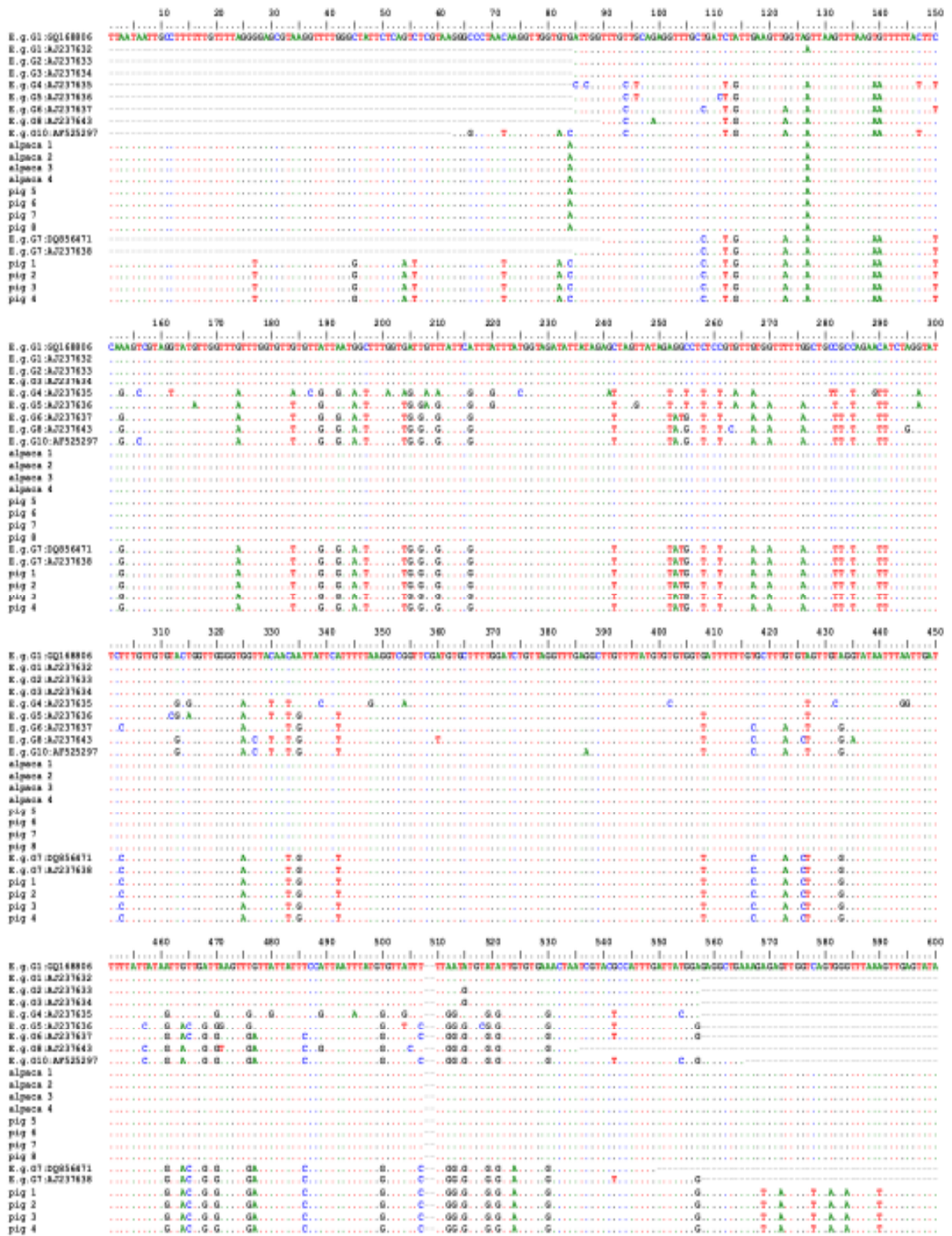
Fig.1. Nucleotide alignment of mitochondrial sequences from *E. granulosus* in Peruvian isolates. The partial CO1 and ND1 sequences were aligned using references obtained from GenBank data base. The sequences from eight isolates, four from alpacas and four from pigs, show identity with the G1 genotype. The sequences of the other four isolates from pigs show identity with G7 genotype sequence

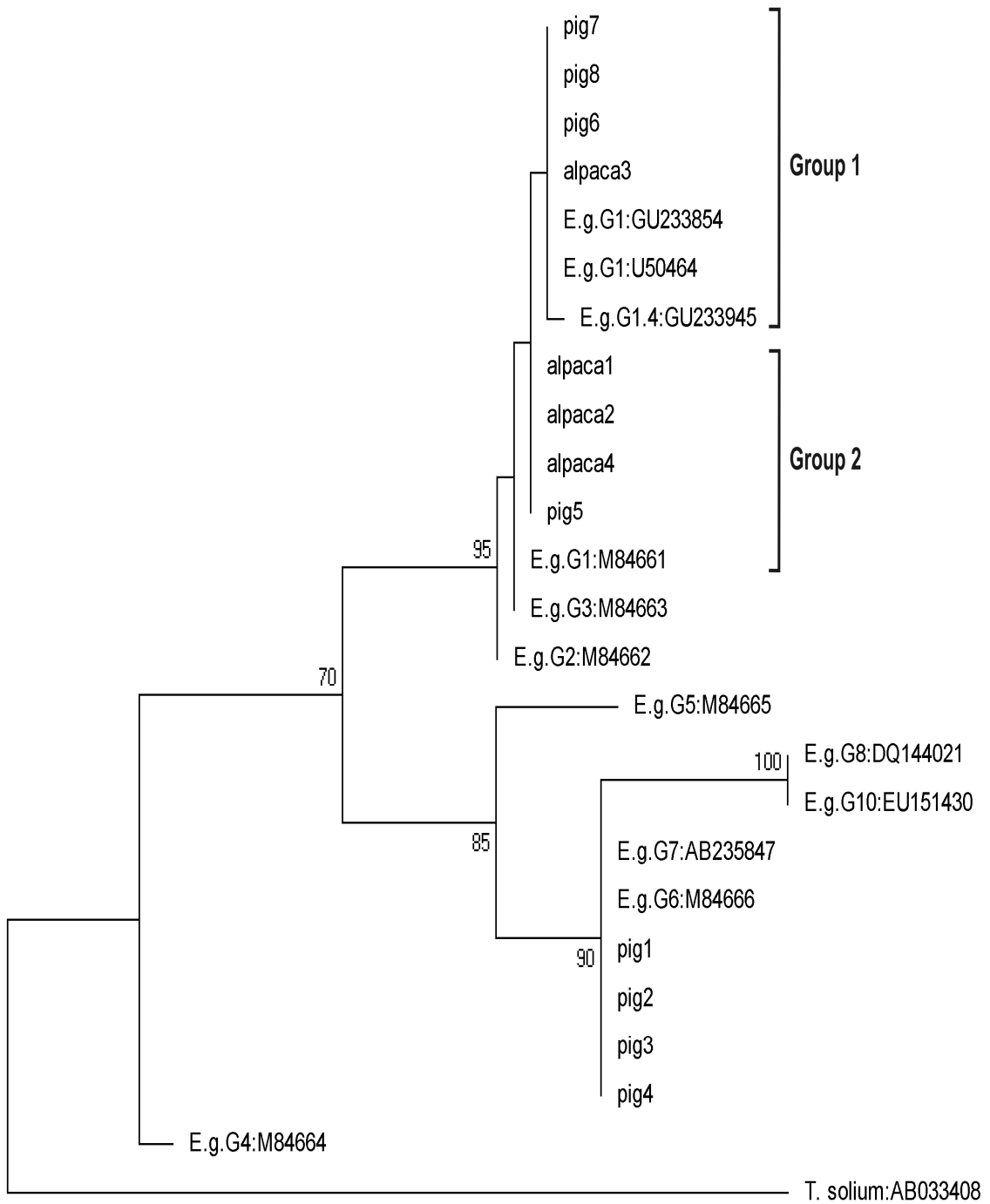
Fig. 2. Phylogenetic tree of sequences from *E. granulosus* isolated in an endemic region of Peru containing reference sequences of other genotypes. The trees were generated using Maximum Likelihood analysis based on an alignment of partial mitochondrial CO1 and ND1 genes. The numbers at the nodes indicate percentage bootstrap support obtained from 1000 replications. A sequence from *Taenia solium* was used as an outlier to root the tree.

C01

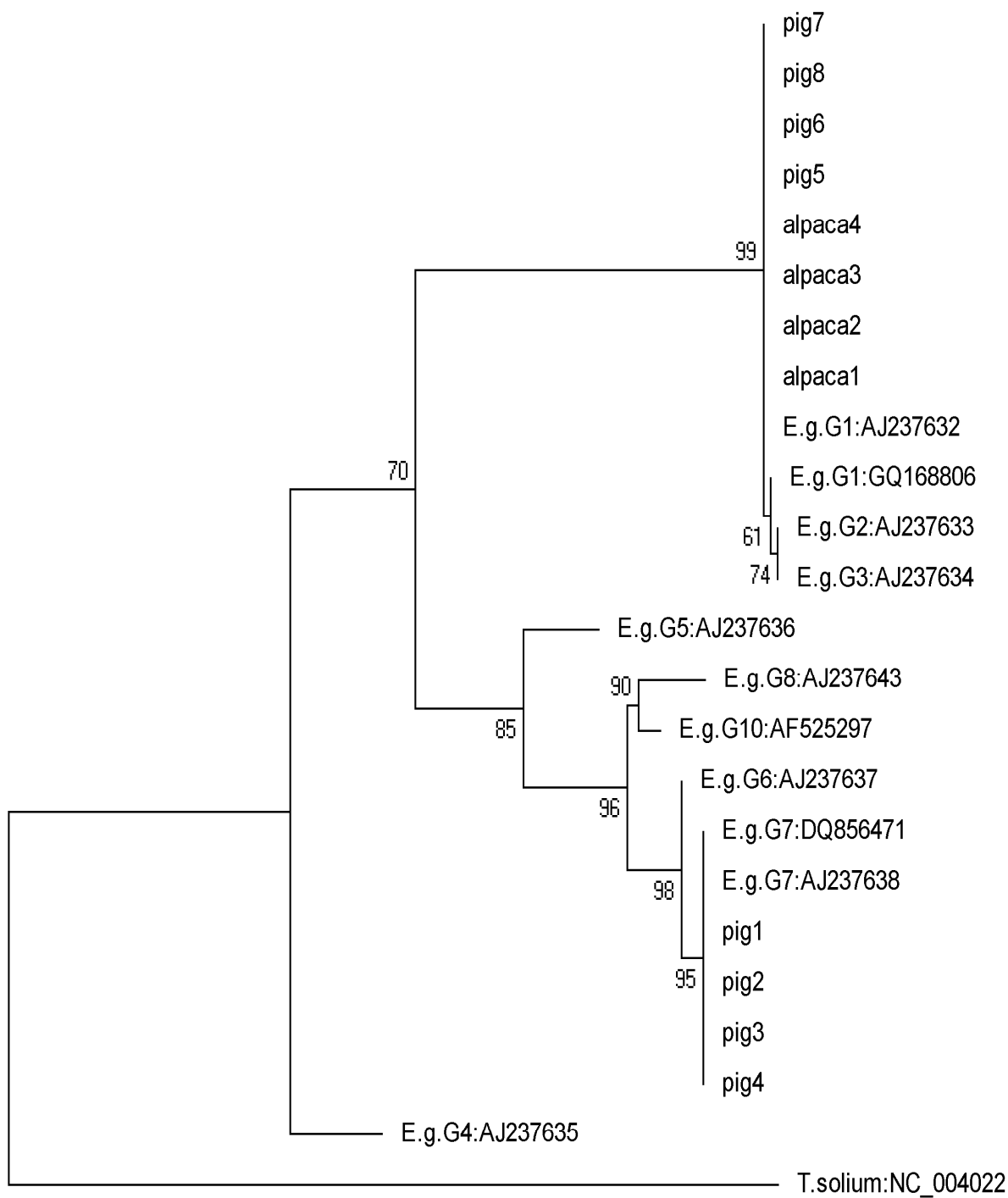


ND1





C01



0.05

ND1

4. RESULTADOS

4.1. Análise das amostras de cistos hidáticos

Do total de 99 cistos hidáticos examinados por microscopia de luz, 59 (59.6%) mostraram ser férteis, ou seja, com presença de protoescolices. Os ganchos rostelares destes apresentaram diferentes formas e tamanhos Fig. 4.1. Os outros 40 (40.4%) cistos foram inférteis, ou seja, sem protoescolices, mais sim apresentavam restos da camada germinativa. Os cistos de ovelha (34/41) apresentaram maior fertilidade em relação aos cistos de boi (11/44). Todos os 14 cistos de humano mostraram ser férteis.

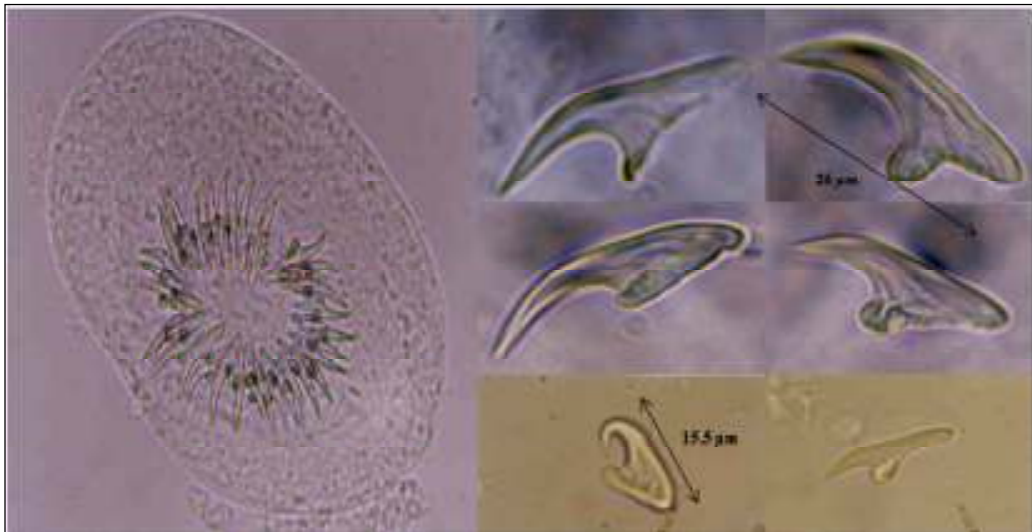


Figura. 4.1. Diferentes formas e tamanhos de ganchos rostelares de isolados de *E. granulosus* (foto: Sánchez E, Laboratório de Referência Nacional de Zoonosis Parasitaria, INS, Peru)

4.2. Análise morfométrica dos ganchos rostelares

A média do tamanho dos ganchos rostelares de *E. granulosus* estão apresentados na Tabela 4.2. A média do maior gancho foi aproximadamente de 26,0 µm e do menor gancho foi de 15,5 µm (Fig. 4.1). Os tamanhos da lâmina + guarda e pega dos ganchos, estão descritas na Tabela 4.1

Tabela 4.1. Morfometria de ganchos rostelares de isolados de *E. granulosus*. Origem geográfica e hospedeiros. Assim como as medidas das estruturas dos ganchos.

Características dos ganchos	Puno		Junín		Arequipa		Cusco		Huancavelica		Ayacucho	
	boi	ovelha	Boi	ovelha	boi	ovelha	boi	humano	boi	humano	ovelha	humano
Nº total ganchos rostelares	100	200	150	650	50	100	250	50	100	50	100	50
Comprimento total médio dos ganchos rostelares (μm)	25.03	24.42	23.43	24.55	25.64	26.00	25.12	25.10	23.56	24.05	24.52	24.08
Ganchos maiores												
Comprimento total (CT/ μm)	28.00	27.75	27.60	27.46	30.00	29.00	28.00	29.90	26.00	27.01	29.00	29.05
Comprimento da lâmina + guarda (C-G/ μm)	19.00	19.00	20.60	18.39	21.00	18.00	19.00	18.03	18.00	18.60	20.01	19.09
Comprimento da pega (CP/ μm)	9.00	8.75	7.00	9.07	9.00	10.00	9.00	8.05	8.00	8.08	8.10	8.9
Ganchos menores												
Comprimento total (CT/ μm)	20.00	20.00	18.00	19.46	22.00	22.00	20.80	19.70	15.50	18.46	18.80	19.46
Comprimento da lâmina + guarda (C-G/ μm)	12.50	12.25	10.40	12.23	15.00	13.00	12.00	12.90	9.00	12.00	12.20	13.00
Comprimento da pega (CP/ μm)	7.50	7.75	7.60	7.23	7.00	9.00	8.20	8.60	6.50	7.25	7.00	7.23

4.3. Análise molecular e filogenética

4.3.1. Resultados da análise pelo gene mitocondrial citocrome C oxidase subunidade 1 (CO1) está descrita no Artigo 1.

“Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit 1 gene”

4.3.2. Resultados da análise pelo gene mitocondrial NAHD deshidrogenase subnidade 1 (ND1) está descrita no Manuscrito 1

“Predominance of *Echinococcus granulosus* G1 genotype in cattle, sheep and humans from endemic regions of Peru assessed by NADH dehydrogenase subunit 1 gene analyze”

4.3.3. Resultados das análise pelos genes mitocondriais CO1 e ND1 dos isolados alpacas e porco estão descritas no Manuscrito 2:

“*Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpaca (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from endemic region of Peru”

4. DISCUSSÃO

Echinococcus granulosus, o parasito que na sua fase larvar é responsável pela EC, encontra-se distribuído mundialmente, portanto, também presente no Peru com implicações sanitárias, veterinárias e econômicas. Nas principais regiões de criação de gado nos Andes peruanos, encontram-se o boi, a ovelha e alpaca que podem atuar como hospedeiros intermediários e o cão pastor como hospedeiro definitivo do parasito, oferecendo assim todas as condições necessárias para a transmissão da EC por *E. granulosus*. Estas condições incluem o beneficiamento domiciliar dos gados infectados, eliminação inadequada das vísceras infectadas com cistos hidáticos, sua utilização na alimentação dos cães, estreita relação do homem-cão e o pouco conhecimento das pessoas sobre a doença causada por este parasito. Todos estes fatores condicionam a manutenção do ciclo de transmissão do parasito. Nestas regiões reporta-se uma das prevalências mais altas do mundo em humanos variando entre 7 a 11% (Moro et al. 1999, Gavidia et al. 2008, Perez, 2007). Na década de 70 foi desenvolvido um programa piloto de controle da doença na região central dos Andes, que diminui a incidência de infecção nos hospedeiros definitivos e intermediários (Náquira, 1993). Atualmente não existe nenhum programa de controle formal no Peru. Adicionalmente a este agravante, deve-se considerar a variabilidade intra-específica presente em *E. granulosus*, constatados em diferentes países do mundo (Bowles et al. 1992,1994, Bowles and McManus 1993c, Scotts et al 1997, Lavikainen et al. 2003). Um passo inicial no controle do ciclo de vida de *E. granulosus* e consequente minimização da infecção por este parasito deve considerar a presença dos genótipo(s) circulante(s) nos hospedeiros intermediários das regiões endêmicas de EC no Peru.

No presente estudo, os resultados das análises dos cistos hidáticos indicam uma alta porcentagem de fertilidades dos cistos de ovinos em relação aos cistos de bovinos, o que significa um alto risco de infectividade destes cistos para o cão, e consequentemente para os seres humanos, como é demonstrado em muitas regiões endêmicas de EC (Eckert and Thompson 1988, Mwambete et al 2004, Andresiuk et al 2009). A análise morfométrica dos ganchos rosetelares de todos os cistos férteis (59) confirmaram o diagnóstico positivo para a *E. granulosus* (Thompson et al. 1995, Thompson and Lymbery, 1988). Os resultados da análise por sequenciamento de uma região do gene CO1 indicaram a circulação de apenas um genótipo G1 (linhagem ovelha comum) de *E. granulosus* no Peru.

A ocorrência do genótipo G1 foi encontrada em todos os 99 isolados de hospedeiros bovinos, ovinos e humanos da região Andina centro-sul do Peru. Resultados semelhantes foram relatados por Santivañez et al (2008) utilizando a mesma abordagem molecular, também mostraram a presença somente do genótipo G1 em 21 isolados de humanos. O genótipo G1 foi também reportado como o genótipo mais frequente em hospedeiros animais e seres humanos por Moro et al. (2009), em outras regiões do Peru. Por outro lado, o genótipo G6 (linhagem camelo) foi identificado em isolados de cabras e em um isolado de humanos por Moro et al (2009) e Santivañez et al (2008) respectivamente. O genótipo G7 (linhagem suína) foi encontrada em isolados de porco em Lima, uma região de baixa endemicidade para EC. Os resultados aqui apresentados representam uma mais exaustiva amostragem de cistos provenientes de regiões produtoras de gado, o que nos permite sugerir que o genótipo G1 de *E. granulosus* é o genótipo predominante nos hospedeiros intermediários das regiões endêmicas de EC no Peru. É também conhecido que o genótipo G1 (linhagem ovelha comum) de *E. granulosus* é o mais comum e infectante, com ampla gama de hospedeiros intermediários, e sua presença está relacionada com as regiões de alta prevalência de EC em humanos em muitos continentes (Craig et al. 2003). Nossa descoberta de uma variante única sugere que mecanismos similares são responsáveis pela sua persistência nas áreas endêmicas estudadas.

Uma microvariante do genótipo G1, a G1⁴, também foi observada em três isolados de ovelha de Ayacucho. Esta microvariante tinha sido descrita anteriormente apenas na Turquia (Vural et al. 2008), pelo que consideramos realizar estudos em maior número de amostras de hospedeiros nesta região para definir a importância epidemiológica da presença da microvariante G1⁴.

A análise dos 99 isolados de *E. granulosus* por sequenciamento de uma região do gene NADH desidrogenase subunidade 1 (ND1), também indica a presença de apenas um genótipo G1 (linhagem ovelha comum). Estes resultados suportam a conclusão anterior baseada no sequenciamento de uma região do gene CO1, confirmando que o genótipo G1 é o genótipo de *E. granulosus* predominante nas regiões endêmicas de EC no Peru.

Somente em 84/99 isolados foi possível se amplificar usando os iniciadores JB11 e JB12 para uma região de ND1 previamente descritas por Bowles & McManus (1993c). O uso de um novo conjunto de iniciadores: EL1F/EL1R desenhados embasados numa região conservada e específica da região do gene ND1 de *E. granulosus* foi capaz de amplificar todas as amostras de DNA estudadas. Usando esta nova estratégia, foi possível amplificar todas as 99 amostras empregadas no estudo, incluindo aquelas que apresentaram algumas mutações no gene ND1 que os impediu de alinhar com os iniciadores descrito por Bowles & McManus (1993c). Cinco mutações foram observadas quando comparadas todas as sequências produzidas com os iniciadores JB11/JB12 e EL1F/EL1R com as sequências de referência do genótipo G1 obtidas no GenBank, evidenciando a presença de dois subgrupos de genótipos G1. Este achado sugere que o uso destes conjuntos de iniciadores (JB11/JB12 e EL1F/EL1R) permite discriminar os dois subgrupos de G1 encontrados nessas regiões endêmicas.

A análise filogenética dos genes CO1 e ND1 foram feitas utilizando os métodos Neighbor-Joining e Maximum Likelihood, baseado nos alinhamentos das sequências dos 99 isolados, e comparadas com as sequências de referência para os genótipos de *E. granulosus* relatados no GenBank. Ambos os métodos mostraram uma árvore onde todas as sequências são agrupadas em grupos correspondentes ao genótipo G1.

A análise por sequenciamento das regiões mitocondriais dos genes CO1 e ND1 dos isolados de alpacas (Departamento de Puno) e porcos (Departamento de Ayacucho), indicam a presença do genótipo G1 em alpacas e ambos os genótipos G1 e G7 em porcos de Ayacucho. Estes resultados mostram também a ocorrência de dois diferentes ciclos de transmissão nestas regiões, para o genótipo G1, o ciclo inclui a ovelha, alpaca, porco/cão e para o genótipo G7 inclui o ciclo ovelha, porco/cão. Neste estudo também foi achado cistos hidáticos férteis em alpacas e porcos, o que significa o incremento de risco da infecção para os cães, quando estes são alimentados com vísceras infectadas com cisto hidático. Em adição podemos mencionar que os cistos férteis foram 4/4 de pulmões e apenas 2/4 originários de fígado de porcos. A alpaca (*Lama pacos*) é um animal de pasto da família dos camelídeos e nativas da região dos Andes peruanos e outros países Sul-Americanos. É criado como fonte de renda para o aproveitamento da lã, sendo que as fibras obtidas a partir da lã compõem o principal produto deste animal com características

têxteis altamente valorizadas. O alto porcentual de fertilidade de cistos de alpaca sugere também um alto risco de infecção para os seres humanos e animais nessas regiões.

O achado do genótipo G7 (cepa suína) em porco de Ayacucho uma região endêmica de EC reforça a constatação deste genótipo em Lima por Moro et al (2009) uma região considerada de baixa endemicidade de EC. Baseado nestes resultados podemos afirmar que os porcos podem ser infectados tanto pelo genótipo G1 como pelo genótipos G7 na região estudada, confirmando assim que os porcos podem ser infectados por mais de um genótipo de *E. granulosus* (Eckert et al. 1993). O genótipo G7 difere na sua morfologia, desenvolvimento, epidemiologia, e genética em relação aos outros genótipos de *E. granulosus* (Eckert and Thompson, 1997). Assim esses apresentam menor tempo de maturação em cães, fato que tem implicações consideráveis para os estudos epidemiológicos e programas de controle da EC. O genótipo G7 já foi descrito anteriormente em isolados humanos da Eslováquia (Tucekova et al. 2003), em isolados de porco da Espanha (Gonzalez et al. 2002), Áustria (Schneider et al. 2010), Argentina (Rosenzvit et al. 1999) e Chile (Manterola et al. 2008). No Peru, ainda não há relatos da presença do genótipo G7 em EC de seres humanos.

O sequenciamento parcial dos genes mitocondriais CO1 e ND1 amplificados por PCR também mostrou a presença de apenas o genótipo G1 (linhagem da ovelha comum) entre todos os isolados da alpaca estudados. Sendo este o primeiro relato de genotipificação de isolados de alpaca em regiões endêmicas do Peru.

O alinhamento das sequências analisadas a partir do gene CO1 (dos isolados de alpacas e porcos) e comparados com as sequências de referências relatadas para o genótipo G1 no GenBank, mostrou uma mutação de um único nucleotídeo constituindo dois grupos de genótipos G1 na árvore filogenética. Esse dado confirma a existencia de dois grupos do genótipo G1 circulantes em duas regiões endêmica do Peru.

5. CONCLUSÕES

A análise molecular dos isolados de *E. granulosus*, baseado nos genes mitocondriais, citocromo C oxidase subunidade 1 e NADH desidrogenase subunidade 1, indicam a predominância de uma variante genética, o genótipo G1 (linhagem ovelha comum) em bovinos, ovinos, e humanos nas regiões endêmicas do Peru.

A análise filogenética do CO1 mostrou a presença de uma microvariante do genótipo G1, a G1⁴, sendo este o primeiro relato desta microvariante na América do Sul.

Embora demonstrado a predominância de apenas o genótipo G1 de *E. granulosus*, pode-se constatar a existência de dois grupos dentro deste genótipo em hospedeiros das regiões endêmicas do Peru.

Em alpaca (*Lama pacos*) esta presente somente o genótipo G1 de *E. granulosus*

O genótipo G1 e o genótipo G7 de *E. granulosus* podem infectar os porcos em Ayacucho, sendo necessário mais estudos a partir de cistos de porcos de outras regiões endêmicas para se confirmar a distribuição do genótipo G7 no Peru. Em adição estudos complementares também são necessários para demonstrar o possível envolvimento do genótipo G7 na doença em humanos.

Desenvolvemos um novo par de iniciadores de PCR (EL1F-EL1R) baseados na região conservada do gene ND1 que proporciona uma abordagem mais robusta para a genotipagem de *E. granulosus* por PCR-sequenciamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andresiuk MV, Ponce Gordo F, Cuesta Bandera C, Elissondo MC, Dopchiz M, Denegri G 2009. *Echinococcus granulosus*: biological comparison of cattle isolates from endemic regions of Argentina and Spain. *Rev Argent Microbiol* 41: 218-225.
- Baker GC, 2002. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 96 (Suppl.): S21-S24.
- Bart JM, Morariu S, Knopp J, Ilie MS 2006. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res* 98: 130-137.
- Bartholomei-Santos ML, Heinzelmann LS, Oliveira RP, Chemale G, 2003. Isolation and characterization of microsatellites from the tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 126: 599-605.
- Bowles J, McManus DP 1993a. Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop* 53: 291-305.
- Bowles J, McManus DP 1993b. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol* 57: 231–240.
- Bowles J, McManus DP 1993c. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol* 23: 969–972.
- Bowles J, Blair D, McManus DP 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54: 65–174.
- Bowles J, Blair D, McManus DP 1994. Molecular genetic characterization of the cervid strain (‘northern form’) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 109: 215-221.
- Bowles J, Blair D, McManus DP 1995. A Molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110: 317-328.

- Busi M, Snábel V, Varcasia A, Garippa G, Perrone V, De Liberato C, D'Amelio S 2007. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol* 150: 75-83.
- Craig PS, Rogan MT, Campos-Ponce M 2003. *Echinococcosis*: disease, detection and transmission. *Parasitology* 127: S5-S20.
- de La Rue M, Dinkel A, Mackenstedt U, Roming T 2006. New data on *Echinococcus* spp. In southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Saõ Paulo* 48: 103-104.
- de La Rue M, Takano K, Brochado JF, Costa CV, Soares AG, Yamano K, Yagi K, Katoh Y, Takahashi K 2011. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil, *Vet Parasitol*. Article in press.
- Eckert J, Deplazes P 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev*, 17(1): 107-135.
- Eckert J, Deplazes P, Craig PS, Gemmell MA, Gottstein B, Heath D, Jenkins DJ, Kamiya M, Lightowlers M. 2001. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment, p. 72–99. In Eckert J, Gemmell MA, Meslin F-X, Pawlowski ZS (ed.), WHO/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. World Organization for Animal Health, Paris, France
- Eckert J, Thompson RCA 1988. *Echinococcus* strains in Europa: a review. *Trop Med Parasit* 39: 1-8.
- Eckert J, Thompson RCA, Kumaratilake SA, Ei Sawah HM 1989. *Echinococcus granulosus* of camel origin: development in dog and parasite morphology. *Parasitol Res* 75: 536-544.
- Eckert J, Thompson RCA, Lymbery A, Pawlowski Z, Gottstein B, Morgan UM 1993. Further evidence for the occurrence of a distant strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. *Parasitol Res* 79: 42-48.

- Eckert J, Thompson RCA 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop* 64: 19-34.
- Gauci C, Heath D, Chow C, Lightowlers MW 2005. Hydatid disease: vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. *Expert Rev Vaccines* 4: 103-32.
- Gavidia CM, Gonzalez AE, Zhang W, Mc Manus DP, Lopera L, Ninaquispe B, Garcia HH, Rodriguez S, Verastegui M, Calderon C, Pan WKY, Gilman RH 2008. Diagnosis of Cystic Echinococcosis, Central Peruvian Highlands. *Emerg Infect Dis* 14 (2): 260-266.
- Gemmell MA 1997. Quantifying transmission dynamics of the family Taeniidae with particular reference to *Echinococcus* spp.: and update, p.54-71. In F.L. Anderse, H. Ouhelli and M. Kachani (ed.), Compendium on cystic echinococcosis in Africa and Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco. Brigham Young University Print Services, Provo, Utah
- González LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC McManus DP, Gárate T, Cuesta-Bandera C 2002. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol* 102: 46-56.
- Haag KL, Araujo AM, Gottstein B, Sile-Lucas M, Thompson RCA, Zaha A 1999. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda;Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology* 118: 63-71.
- Hobbs RP, Lymbery AJ, Thompson RC 1990. Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian host, and its implications for strain recognition. *Parasitology* 101: 273-281.
- Hünter M, Nakao M, Wassermann T, Siefert L, bomber JDF, Dinkel A, Sako Y, Mackenstedt U, Romig T, Ito A 2007. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* Ortlepp, 1937 (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol* 38: 861-868.

- Jenkins DJ, Tomig T, Thompson RCA 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.- a global update. *Inter J Parasitol* 35: 1205-1219.
- Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, Garcia GE, Rosenzvit MC 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and human in Argentina. *Infect Genet Evol* 2: 129-136.
- Kedra AH, Swiderski Z, Tkach VV, Dubinsky P, Pawlowski Z, Stefaniak J, Pawlowski J 1999. Genetic analysis *Echinococcus granulosus* from human and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitology* 44: 248-254.
- Kedra AH, Tkach VV, Swiderski Z, Pawlowski Z, Emets A, Pawlowski J 2000. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from a wild boar. *Acta Parasitol* 45 (2): 121-122.
- Kumaratilake LM, Thompson RCA, Eckert J 1986. *Echinococcus granulosus* of equine origin from different countries possess uniform morphological characteristics. *Int J Parasitol* 16: 529- 540.
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127: 207-215.
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Laaksonen S, Agren E, Oksanen A, Meri S 2006. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology* 133: 565-570.
- Le TH, Pearson MS, Blair D, Dai N, Zhang LH, McManus DP 2002. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 124: 97-112.

- Lopez-Neyra CR, Soler Planas MA 1943. Revision del genero *Echinococcus* Rud y description de una especie nueva Parasita intestinal del perro en Almeria. *Rev Ibérica Parasitol* 3: 169-194.
- Lymbery AJ, Thompson RC 1988. Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australian. *Int J Parasitol* 18: 803-811
- Manterola C, Benavente F, Melo A, Vial M, Roa JC 2008. Description of *Echinococcus granulosus* genotypes in human hydatidosis in a region of Souther Chile. *Parasitol Int* 57: 342-346.
- Maravilla P, Thompson RCA, Palacios-Ruiz JÁ, Estcourt A, Ramirez-Solis E, Mandragon-de-la-Peña C, Moreno-Moller M, Cardenas-Mejia A, Mata-Miranda P, Aguirre-Alcantara MT, Bonilla-Rodriguez C, Flisser A 2004. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Act Trop* 92: 231-236.
- McManus DP 2002. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 (Suppl I): S151–S157.
- McManus DP 2004. Molecular taxonomy and epidemiology of cystic *Echinococcus*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 35 (Suppl).
- McManus DP, Bowles J 1996. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in applied parasitology and systematics. *Int J parasitol* 26: 687-704.
- McManus DP, Thompson RC 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127: S37–S51.
- Moks E, Jogisalu I, Valdmann H, Saarma U 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology* 135: 647-654.

- Moks E, Saarma U, Talvik U, Valdmann H 2005. Helminthological survey of wild canids in Estonia. In Extended Abstracts of the XXVIIth Congress of the International Union of Game Biologists, Hannover 2005 (ed. Pohlmeier K) 421 DSV-Verlag, Hamburg.
- Moro P, Caverro C, Tambini M, Briceño Y, Jimenez R, Cabrera L 2008. Practicas Conocimiento y Actitudes sobre La Hidatidosis Humana en Poblaciones Procedentes de Zonas Endémicas. *Rev Gastroenterol* 28: 42-49.
- Moro P, Gilman RH, Verastegui M, Bern C, Silva B, Bonilla JJ 1999. Human hydatidosis in the central Andes of Peru: evolution of the disease over 3 years. *Cin Infect Dis* 29: 807-12.
- Moro PL, McDonald J, Gilman RH, Silva B, Verastegui M, Malqui V, Lescano G, Falcon N, Montes G, Bazalar H 1997. Epidemiology of *Echinococcus granulosus* infection in the central Peruvian Andes. *Bull World Health Organ* 75 (6): 553 – 561.
- Moro P L, Nakao M, Ito A, Shantz PM, Caverro C, Cabrera L 2009. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. *Parasitol Int* 58:184-186.
- Mwambete KE, Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C 2004. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Act Trop* 91: 87-93.
- Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A 2007. A molecular phylogeny of the *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134(Pt 5): 713-22.
- Nakao M, Li T, Han X, Ma X, Xiao N, Qiu J, Wang H, Yanagida T, Mamuti W, Wen H, Moro PL, Giraudoux P, Craig PS, Ito A 2010. Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *In J Parasitol* 40(03): 379-85.

- Náquira C 1993. Situación de la Hidatidosis en el Perú. In *Memorias de la reunión del grupo científico sobre avances en la prevención, control y tratamiento de la hidatidosis*, Pan American Health Organization, Washington, p 217-229.
- Obwaller A, Schneider R, Walochnik J, Gollackner B, Deutz A, Janitschke K, Aspöck H, Auer H 2004. *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome *c* oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology* 128: 569-575.
- Ortlepp RJ 1937. South African Helminths, Part I. *Onderstepoort J Vet Sci Anim. Ind* 9: 311-336
- Otarola SG 1966. [Epidemiology of hidatidosis in Peru]. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 60: 144-153.
- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M 2008. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 7: 861-871.
- Pawlowski ZS, Eckert J, Vuitton RW, Ammann P, Kern PS, Craig FK, Dar F, De Rosa C, Filice B, Gottstein B, Grimm F, Macpherson CNL, Sato N, Todorov T, Uchino J, von Sinner W, Wen H 2001. Echinococcosis in human : clinical aspects, diagnosis and treatment . In Eckert J, Gemmell M.A, Meslin FX, Pawłowski ZS(ed.). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. World Health Organization/World Organization for animal Health: Paris, France.
- Pérez LCR 2007. *Proyecto de Control de hidatidosis en el Perú por vigilancia epidemiológica*. PhD Thesis, Universidad Mayor de San Marcos, Lima Perú, p 132.
- Rausch RL 1967, A consideration of interspecific categories in the genus *Echinococcus* Rudolphi, 1801 (Cestoda Taenidae) *J Parasitol* 53: 484-491.

- Rausch RL 1995. Life cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In Thompson RCA, Lymbery AJ (Eds), *echinococcus and hydatid Disease. CAB International*, Wallingford, 89-134.
- Rausch RL, Nelson GS 1963. A Review of the Genus *Echinococcus* Rudolphi, 1801. In *Ann Trop Med Parasitol* 57(2).
- Rinaldi L, Maurelli MP, Capuano F, Perugini AG, Veneziano V, Cringoli S. 2008. Molecular Update on Cystic Echinococcosis in Cattle and Water Buffaloes of Southern Italy. *Zoonoses Public Health* 55: 119-123
- Romig T 2003. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg* 388(4): 209-217.
- Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int* 55 Suppl: S187-191.
- Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118: 523-530.
- Sanchez E, Caceres O, Naquira C, Garcia D, Patiño G, Herrera S, Volotão A, Fernandes O 2010. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105 (6): 806-810.
- Santivañes SJ, Gutierrez AM, Rosenzvit MC, Muzulin PM, Rodriguez ML, Vasquez, JC, Rodriguez S, Gonzalez AE, Gilman RH, Garcia HH 2008. The Cysticercosis Working Group in Peru. Human Hydatid Disease in Peru is Basically Restricted to *Echinococcus granulosus* Genotypes G1. *Am J Med Hyg* 79: 89-92.

- Schantz P, Chai J, Eckert J, Jenkins DJ, Macpherson CNL, Thakur A 1995. Epidemiology and control of hydatid disease. In: Thompson RCA, Lymbery AJ (Eds), *Echinococcus* and hydatid disease. *CAB International*, Wallingford, Oxon. 232-331.
- Scott J C, McManus D P 1994. The Random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. *Trop Med Parasitol* 45(1):1-4.
- Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP 1997. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 114: 37-43.
- Siles-Lucas M, Felleisen R, Cuesta-Bandera C, Gottstein B, Eckert J 1994. Comparative genetic analysis of Swiss and Spanish isolates of *Echinococcus granulosus* by southern hybridization and random amplified polymorphic DNA technique. *Applied Parasitology* 35: 107-117.
- Simsek S, Balkaya I, Koroglu E 2010. Epidemiological survey and molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in cattle in an endemic area of eastern Turkey. *Vet Parasitol* 172: 347-349.
- Sharbatkori M, Harandi MF, Mirhendi H, Hajjalilo E, Kia EB 2011. Sequence analysis of *cox1* and *nad1* genes in *Echinococcus granulosus* G3 genotype in camel (*Camelus dromedarius*) from central Iran. *Parasitol Res* 108: 521-527.
- Schneider R, Gollackner B, Schindl M, Tucek G, Auer H 2010. *Echinococcus Canadensis* G7 (Pig Strain): An Underestimated Cause of Cystic Echinococcosis in Austria. *Am J Med Hyg* 82 (5): 871-874.
- Snabel V, D'Amelio S, Mathiopoulos K, Turceková L, Dubinsky P 2000. Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *J Heminthol* 74: 177-181.

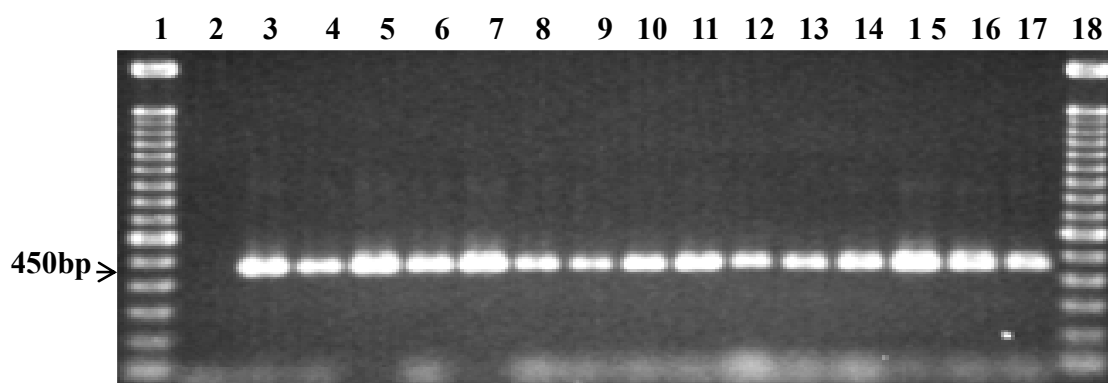
- Soriano SV, Pierangeli NB, pianciola L, Mazzeo M, Lazzarini LE, Saiz MS, Kossman AV, Bergagna HFJ, Chartier K, Basualdo JA 2010. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquén, Patagonia Argentina. *Parasitol Int* 59: 626-628.
- Sweatman GK, Williams RJ 1963. Comparative studies on the biology and morphology of *Echinococcus granulosus* from domestic livestock, moose and reindeer. *Parasitology* 53: 339-390
- Thompson RCA 2008. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol* 119: 439-446.
- Thompson RCA, Boxell AC, Ralston BJ, Constantine CC, Hobbs RP, Shury T, Olson E 2006. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. *Parasitology* 132: 439-447.
- Thompson RCA, Kumaratilake LM, Eckert J 1984. Observations on *Echinococcus granulosus* of cattle origin in Switzerland. *Int J Parasitol* 14: 283-291.
- Thompson RCA, Limbery AJ 1991. The epidemiological significance of biological variation in *Echinococcus*. *Arch Hidatid* 30: 195-200.
- Thompson RCA, Limbery AJ 1988. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 27: 210-263.
- Thompson RCA, Limbery AJ, Constantine CC 1995. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 35: 145-176.
- Thompson RCA, McManus DP 2001. Aetiology: parasites and life cycles. In Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX & Pawlowski ZS. *Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*, WHO/OIE, France, p 1-9.

- Thompson RCA, McManus DP 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18: 452-457.
- Torgenson PR 2006. Canid immunity to *Echinococcus* spp: impact on transmission. *Parasite Immunol* 28: 295-303.
- Torgenson PR, Budke CM 2003. Echinococcosis – an international public health challenge. *Res Vet Sc* 74: 191-202.
- Turceková L, Snábel V, D'Amelio S, Busi M, Dubinský P 2003. Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Trop* 85: 223-229.
- Varcasia A, Canu S, Lightowers MW, Scala A, Garippa G 2006. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strain in Sardinia. *Parasitol Res* 98: 273-277.
- Villalobos N, González LM, Morales J, Aluja AS, Jiménez MI, Blanco MA, Harrison LJS, Parkhouse RME, Gárate T 2007. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. *Vet Parasitol* 147: 185-189.
- Vural G, Unsal A, Gauci C, Bagci O, Gicik Y, Lightowers M 2008. Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome c oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Vet Parasitol* 154: 347-350.
- Wachira TM, Bowles J, Zeyhle E, McManus DP 1993. Molecular examination of the sympatry and distribution of sheep and camel strains of *Echinococcus granulosus* in Keya. *Am J Trop Med Hyg* 48: 473-479.
- WHO/OIE, 2001. Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern (ed. Eckert J, Gemmell M.A, Meslin FX, Pawłowski ZS), pp. 1-9. World Health Organization/World Organization for animal Health: Paris.

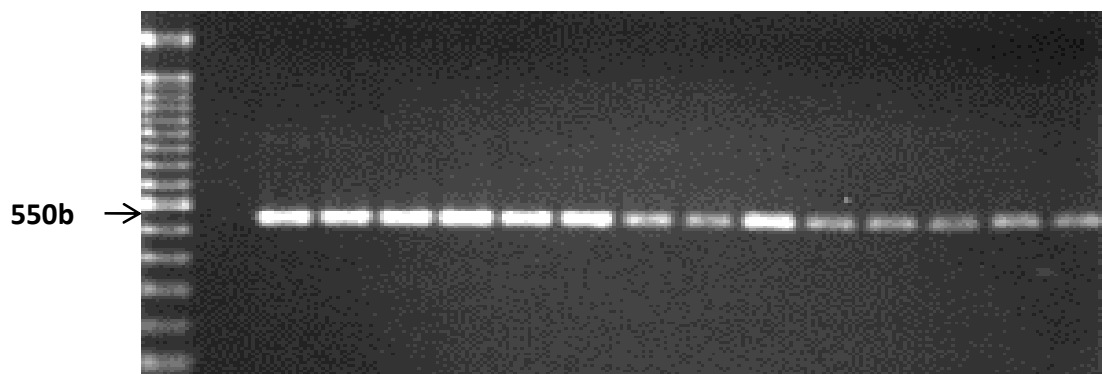
- Williams RJ, Sweatman GK 1963. On the transmission, biology and morphology of *Echinococcus equinus*, a new subspecies of hydatid tapeworm in horses in Great Britain. *Parasitology* 53: 391-407.
- Worbes H 1992. Zum Vorkommen von *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* in Thuringen. *Angew. Parasitol* 33: 193-204.
- Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS and Ito A 2005. *Echinococcus shiquicus n. sp.*, a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol* 35 (6): 693-701.
- Zapatel J, Guerrero C, Escalante J 1962. [Hydatidosis in Peru]. *Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana* 52: 296-308.
- Zhang L, Eslami A, Hosseini SH, McManus DP 1998. Indication of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. *Am J Med Hyg* 59: 171-174.
- Zhang YL, Bart JM, Wen H, Ma XL, Miao YQ, Lin RY 2005. Molecular evidence of sheep (G1) and camel (G6) strains of *Echinococcus granulosus* in Xinjiang, China. *Chin J Parasit Dis Control* 18: 333-335.
- Zhang L, Gasser RB, Zhu X, McManus DP 1999. Screening for different genotypes of *Echinococcus granulosus* within China and Argentina by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 329-334.

8. ANEXOS

8.1. Eletroforese em gel de agarose a 1% corados com Brometo de Etídio de produtos de PCR-CO1 (450pb) de isolados de *E. granulosus* de diferentes hospedeiros intermediários das regiões endêmicas do Peru. 1: marcador de peso molecular (100bp); 2 controle negativo (água); 3,4 (Puno: boi, ovelha); 5,6 (Junín: boi, ovelha); 7,8 (Cusco: boi); 9,10 (Arequipa: boi, ovelha); 11,12 (Huancavelica: boi, ovelha); 13,14 (Ayacucho: ovelha); 15,16 (Humano); 17 controle positivo *E. granulosus* G1; 18 marcador de peso molecular (100bp).



8.2. Eletroforese em gel de agarose a 1% corados com Brometo de Etídio de produtos de PCR-ND1 (cebadores: JB11-JB12) (550pb) de isolados de *E. granulosus* de diferentes hospedeiros intermediários das regiões endêmicas do Peru. 1: marcador de peso molecular (100bp); 2 controle negativo (água); 3,4 (Puno: boi, ovelha); 5,6 (Junín: boi, ovelha); 7 (Cusco: boi); 8,9 (Arequipa: boi, ovelha); 10,11 (Huancavelica: boi, ovelha); 12,13 (Ayacucho: ovelha); 14,15 (Humano); 16 controle positivo *E. granulosus* G1.



8.3. Eletroforese em gel de agarose a 1% corados com Brometo de Etídio de produtos de PCR-ND1 (cebadores: EL1F-EL1R) (800pb) de isolados de *E. granulosus* de diferentes hospedeiros intermediários das regiões endêmicas do Peru. 1: marcador de peso molecular (100bp); 2 controle negativo (água); 3,4 (Puno: boi, ovelha); 5,6 (Junín: boi, ovelha); 7,8 (Cusco: boi); 9,10 (Arequipa: boi, ovelha); 11,12 (Huancavelica: boi, ovelha); 13,14 (Ayacucho: ovelha); 15,16 (Humano); 17 controle positivo *E. granulosus* G1; 18 marcador de peso molecular (100bp).

