



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Leandro Batista das Neves

**Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a
detecção de DNA de *Echinococcus* sp. em fezes de cães domésticos
(*Canis familiaris*) do estado do Acre, Brasil**

Rio de Janeiro

2016

Leandro Batista das Neves

Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de DNA de *Echinococcus* sp. em fezes de cães domésticos (*Canis familiaris*) do estado do Acre, Brasil

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Silva

Coorientadora: Prof.^a Dra. Rosângela Rodrigues Silva

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N455 Neves, Leandro Batista das.

Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de DNA de *Echinococcus sp.* em fezes de cães domésticos (*Canis familiaris*) do estado do Acre, Brasil /Leandro Batista das Neves. – 2016.

110 f.

Orientador: José Roberto Machado Silva.

Coorientadora: Rosângela Rodrigues Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Reação em cadeia da polimerase - Teses. 2. Equinococose - Teses. 3. Echinococcus. 4. Cães - Teses. I. Silva, José Roberto Machado. II. Silva, Rosângela Rodrigues. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 599.742.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Leandro Batista das Neves

Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de DNA de *Echinococcus* sp. em fezes de cães domésticos (*Canis familiaris*) do estado do Acre, Brasil

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 11 de março de 2016.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Silva
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Rosângela Rodrigues Silva
Instituto Oswaldo Cruz

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva
Escola Nacional de Saúde Pública

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a Deus, autor e mantenedor da minha vida e ao Miguel, meu filho lindo, pessoa mais forte que eu conheço.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente é a Deus que agradeço por tudo. Este tudo corresponde ao planejamento da minha existência, a manutenção da minha vida, pela sabedoria concedida para enxergar e agarrar as oportunidades do viver e pelas bênçãos refletidas através do sorriso do meu filho, da felicidade da minha família e da conclusão desse curso.

Agradeço a minha família, sobretudo aos meus pais Admar e Ana Neves pelos cuidados, proteção e por proverem meus caminhos sempre atrelados a importância dos estudos, além dos exemplos de honestidade, amizade e humildade direcionados a mim; ao meu filho Miguel, exemplo de persistência, força e luta, sendo o fenômeno que mantém o amor constante que sinto pela sua vida e seu sorriso; a minha namorada Fernanda Bittencourt e sua família por todo apoio, incentivo e cuidados, principalmente pela ajuda e tranquilidade nos meus momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Dr. José Roberto pela confiança e exemplo de dedicação profissional, refletido em sua recente conquista do exercício do cargo de membro presidente da Sociedade Brasileira de Parasitologia; a Rosângela Rodrigues, minha co-orientadora e coordenadora do SRNH-IOC/Fiocruz-RJ por toda ajuda, provimento de recursos e articulação dos contatos necessários para que o trabalho fosse desenvolvido. Por não ter desistido do meu trabalho enquanto eu, recém-integrante da equipe, vivi o momento mais difícil da minha vida, até aqui. Pela confiança no meu trabalho, na minha recuperação, reintegração e readaptação, além de todo o apoio e otimismo que sempre tratou o meu futuro profissional no âmbito do seu laboratório.

A todos do LHPV-IOC/Fiocruz-RJ pelos incentivos e apoio, destacando Jéssica Santos, Tuan Pedro e Simone Mendes. A toda ajuda, paciência e atenção disponibilizada pela Dra Fernanda Almeida em todos os momentos que precisei. Um agradecimento especial para Fernanda Bittencourt e Daniel Garcia que juntamente com Paulo Teixeira (IFAC-AC) e Sidnei Silva (INI-Fiocruz-RJ) foram os meus quatro pilares na execução prática do trabalho.

Ao Dr. Henrique Ferreira (UFRGS) e Guilherme Santos (UFRGS) pela doação das amostras controles de DNA de *Echinococcus*; a Dra Luciana Trilles (INI/Fiocruz-RJ) pelo auxílio na análise dos resultados do sequenciamento; e ao Dr. Rodrigo Menezes (INI/Fiocruz-RJ) pelo auxílio na identificação dos ovos de helmintos encontrados.

E o meu “muito obrigado!” para todas as pessoas, amigos e familiares que ajudaram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse executado.

O ser humano é definido por aquilo que faz. Não por aquilo que pensa, ouve ou fala. A vida é curta, heterogênea e altamente dinâmica. Ao desfrutarmos da capacidade de respirar, a liberdade é uma dádiva. Ser feliz é uma escolha diária. Se é uma verdade que todos nós somos iguais sob um mesmo ponto de vista, bênçãos também estarão acessíveis para todos. Felizmente.

Leandro Batista das Neves

RESUMO

NEVES, Leandro Batista das. *Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de DNA de Echinococcus sp. em fezes de cães domésticos (Canis familiaris) do estado do Acre, Brasil*. 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A equinococose é uma infecção zoonótica na qual canídeos albergam os helmintos adultos no intestino delgado e ruminantes e roedores possuem a fase larval (metacestóide) no fígado e pulmões. Os seres humanos são hospedeiros acidentais. Entre as espécies de *Echinococcus* confirmadas no Brasil, *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.), o agente causador da equinococose cística (CE), é comum no Rio Grande do Sul, especialmente nas fronteiras com Argentina e Uruguai. No ciclo biológico, os cães domésticos e bovinos e ovinos são os hospedeiros definitivos e intermediários, respectivamente. Por outro lado, *Echinococcus vogeli* é o causador da equinococose policística (PE) e o ciclo natural de sua transmissão no norte do Brasil registra uma relação predador-presa entre o cachorro-vinagre e a paca, os hospedeiros definitivo e intermediário, respectivamente. Além disso, um ciclo sinantrópico é estabelecido quando o homem volta da caça e alimenta os cães com as vísceras de pacas abatidas. Os cães se infectam com metacestóides presentes no fígado e passam a desempenhar um papel como hospedeiros definitivos em um ciclo doméstico, contaminando o ambiente peridomiciliar com ovos do parasito eliminados com as fezes. No Acre, casos anteriores de pacas infectadas, casos clínicos de equinococose policística humana e sorologia positiva para a PE foram relatados. Os casos humanos mostraram fatores epidemiológicos associados a PE. No entanto, o papel dos cães domésticos no elo entre a infecção humana e o ciclo natural que envolve *E. vogeli* é pouco conhecido e as aplicações de metodologias moleculares para a avaliação da infecção por *E. vogeli* em cães domésticos são inexistentes na literatura. Esse estudo teve como objetivo analisar amostras de fezes de cães do Acre para a detecção de *Echinococcus* sp. por meio da técnica de PCR utilizando o gene *cox 1*. Setenta e cinco amostras fecais (14 de Sena Madureira, 06 de Rio Branco, 07 de Bujari, 36 de Xapuri e 12 de Epitaciolândia) foram submetidas a exame parasitológico de rotina (sedimentação espontânea). Os sedimentos foram também submetidos à extração de DNA e cada material resultante à PCR. Este estudo mostrou contaminação ambiental por fezes de cães em todos os 44 locais de coleta sendo que 41,33% das amostras estavam contaminadas com ovos de helmintos derivados de 23 (52,27%) pontos. Um total de 06 amostras foram positivas na PCR, no entanto, *Echinococcus* foi confirmado pelo sequenciamento do DNA em apenas 02. Uma amostra de *E. granulosus* s.s. (G1) e uma de *E. vogeli* mostraram 100% de homologia com as sequências de referência depositadas no GenBank. Este é o primeiro estudo realizado no norte do Brasil para avaliar a frequência de *Echinococcus* sp. em cães domésticos; *E. vogeli* é um achado esperado, uma vez que é uma área de transmissão da PE. A constatação de *E. granulosus* s.s., no entanto, é um resultado inesperado tendo em vista que a distribuição geográfica é a área mais ao sul do Brasil. Do ponto de vista epidemiológico, os cães domésticos infectados pode ser um fator de risco para a transmissão da equinococose, considerando um cenário com ambos os agentes etiológicos.

Palavras-chave: *Echinococcus*. Equinococose. Cães. Diagnóstico. PCR.

ABSTRACT

NEVES, Leandro Batista das. *Application of polymerase chain reaction (PCR) for the Echinococcus sp. DNA detection in feces of domestic dogs (Canis familiaris) of Acre, Brazil*. 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Echinococcosis is a zoonotic infection in which canids harbor adult tapeworms in the small intestine and ruminants and rodents have the larval stage (metacestode) in the liver and lungs. Humans are incidental hosts. Among the valid species of *Echinococcus* in Brazil, *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) the causative agent of cystic echinococcosis (CE) is common in Rio Grande do Sul, especially on the borders with Argentina and Uruguay. In the life cycle, domestic dogs, cattle and sheep are definitive and intermediate host, respectively. In the other hand, *Echinococcus vogeli* causes polycystic echinococcosis (PE) and the natural cycle of transmission in northern Brazil enrolls a predator-prey relationship between the bush dog and the paca, the definitive and intermediate hosts, respectively. In addition, a synanthropic cycle is established when human comes back from hunting and feeds domestic dogs with the entrails of slaughtered pacas. Dogs become infected with liver metacestodes and play a role as definitive hosts in a domestic cycle, contaminating the peridomestic environment with parasite eggs eliminated with their feces. In state of Acre, previous cases of infected pacas, clinical cases human of polycystic echinococcosis and positive serology for PE have been reported. The human cases show epidemiological factors associated with PE. However, the role of domestic dogs in the link in the link between human and natural infection cycle involving *E. vogeli* is little known and applications of molecular methods for assessing infection by *E. vogeli* in domestic dogs are lacking in literature. This study aimed to analyze samples from dogs feces from Acre for detecting *Echinococcus* sp. through the PCR technique using the *cox 1* gene. Seventy-five fecal samples (14 from Sena Madureira, 06 from Rio Branco, 07 from Bujari, 36 from Xapuri and 12 from Epitaciolândia) were submitted to routine parasitological examination (spontaneous sedimentation). The sediments were also subjected to DNA extraction and each resulting material to PCR. This study showed environmental contamination by feces of dogs in all 44 collection sites and 41.33% of samples were contaminated with helminth eggs in 23 (52.27%) points. A total of 06 samples were positive in the PCR, however, *Echinococcus* was confirmed only in 02 samples by DNA sequencing. One sample of *E. granulosus* s.s. (G1) and one of *E. vogeli* showed 100% homology with the reference sequences deposited in GenBank. This is the first study carried out in northern Brazil to evaluate the occurrence of *Echinococcus* sp. in domestic dogs; *E. vogeli* is an expected finding since it is a PE transmission area. *E. granulosus* s.s. finding, however, is an unexpected one given that the geographical distribution is the southern area in Brazil. From an epidemiological point of view, infected domestic dogs may be a risk factor for echinococcosis transmission, considering the outstanding scenery of both etiological agents.

Keywords: *Echinococcus*. Echinococcosis. Dogs. Diagnostic. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Imagem do cachorro-vinagre (<i>Speothos venaticus</i>)	23
Figura 2 –	Representação esquemática do verme adulto de <i>Echinococcus vogeli</i> ..	23
Figura 3 –	Representação esquemática do metacestóide do <i>Echinococcus</i> sp.	24
Figura 4 –	Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Echinococcus vogeli</i>	25
Figura 5 –	Imagem da paca (<i>Cuniculus paca</i>)	25
Figura 6 –	Localização das áreas estudadas no Acre	41
Figura 7 –	Mapa do Acre	42
Figura 8 –	Imagens representativas dos pontos de coleta das áreas de estudo	47
Figura 9 –	Imagens representativas das características dos cães das áreas de estudo	47
Figura 10 –	Imagens das fezes de cães no ambiente e da coleta de amostras	48
Figura 11 –	Municípios do Acre com os pontos de coleta do estudo	60
Figura 12 –	Ovos de cestódeos encontrados nas amostras de fezes	64
Figura 13 –	Ovos de nematódeos encontrados nas amostras de fezes	65
Figura 14 –	Ovos de <i>Toxocara</i> sp. encontrados nas amostras de fezes	66
Figura 15 –	Resultados do teste de reprodutibilidade da PCR	68
Figura 16 –	Resultados do teste de sensibilidade da PCR (DNA de <i>E. granulosus</i> s.s.)	69
Figura 17 –	Resultados da PCR com as amostras do estudo	70
Figura 18 –	Resultados da PCR de contraprova após <i>spiking</i>	71
Figura 19 –	Sequência (425 bp) de parte do gene mitocondrial <i>cox 1</i> do DNA de <i>E. vogeli</i> detectado na amostra 18-SM-A de Sena Madureira (Ponto de coleta 1)	72
Figura 20 –	Sequência (424 bp) de parte do gene mitocondrial <i>cox 1</i> do DNA <i>E. granulosus</i> s.s. (G1) detectado na amostra 01-RB-B de Rio Branco (Ponto de coleta 4)	73
Figura 21 –	Análise realizada no BLAST-NCBI após alinhamento entre as sequências compatíveis com <i>Echinococcus</i> sp. obtidas nas amostras do estudo 18-SM-A e 01-RB-B	75

Figura 22 – Sequência de parte (415 bp) do gene mitocondrial <i>cox I</i> do DNA detectado na amostra 09-X-C de Xapuri (Ponto de coleta 11)	76
Figura 23 – Sequência (416 bp) de parte do gene mitocondrial <i>cox I</i> do DNA detectado na amostra 29-X-A de Xapuri (Ponto de coleta 31)	76
Figura 24 – Sequência (427 bp) de parte do gene mitocondrial <i>cox I</i> do DNA detectado na amostra 31-X-A de Xapuri (Ponto de coleta 33)	77
Figura 25 – Sequência (417 bp) de parte do gene mitocondrial <i>cox I</i> do DNA detectado na amostra 33-E-A de Epitaciolândia (Ponto de coleta 35) ...	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Localidade, quantitativo, ambiente e ano de coleta das amostras de fezes do Acre	46
Tabela 2 –	Reagentes, concentrações e volumes utilizados na PCR para o gene Cox1.	53
Tabela 3 –	Informações sobre os pontos de coleta em Sena Madureira-AC	57
Tabela 4 –	Informações sobre os pontos de coleta em Rio Branco-AC	58
Tabela 5 –	Informações sobre os pontos de coleta em Bujari-AC	58
Tabela 6 –	Informações sobre os pontos de coleta em Epitaciolândia-AC	58
Tabela 7 –	Informações sobre os pontos de coleta em Xapuri-AC	59
Tabela 8 –	Resultado do exame parasitológico de fezes de cães por município de estudo do Acre	61
Tabela 9 –	Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Sena Madureira	62
Tabela 10 –	Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Rio Branco	62
Tabela 11 –	Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Bujari .	62
Tabela 12 –	Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Xapuri	63
Tabela 13 –	Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Epitaciolândia	63
Tabela 14 –	Resultado da análise morfométrica dos ovos de helmintos encontrados	67
Tabela 15 –	Localidade e quantitativo de amostras positivas e negativas na PCR	69
Tabela 16 –	Informações sobre as amostras positivas na PCR	70
Tabela 17 –	Similaridade entre a sequência obtida na amostra 18-SM-A com sequências de <i>E. vogeli</i> depositadas no GenBank	73
Tabela 18 –	Similaridade entre a sequência obtida na amostra 01-RB-B com sequências de <i>E. granulosus</i> s.s. (G1) depositadas no GenBank	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag4	Marcador nuclear para maleato desidrogenase
AE	Tampão AE do kit QIAamp (QIAGEN)
AL	Tampão AL do kit QIAamp (QIAGEN)
ASL	Tampão ASL do kit QIAamp (QIAGEN)
AW1	Tampão AW1 do kit QIAamp (QIAGEN)
AW2	Tampão AW2 do kit QIAamp (QIAGEN)
CA-ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - coproantígeno
<i>cox I</i>	Citocromo c oxidase – subunidade 1
CO1f	Iniciador direto 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3'
CO1r	Iniciador reverso 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
Eg10	Marcador nuclear para o antígeno 10
ERK	Marcador nuclear para quinase reguladora de sinal extracelular
FEA	Floresta Estadual do Antimary
GPS	Sistema de posicionamento global
Ir	Marcador nuclear para receptor de insulina
IST	Técnica de raspagem intestinal
LMC	Larva Migrans Cutânea
LMV	Larva Migrans Visceral
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
PAE	Projeto de Assentamento Extrativista
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVP	Polivinilpirrolidona
P-29	Marcador nuclear para o antígeno P-29
12S rRNA	Subunidade 12S do RNA ribossomal

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro(s)
mL	Mililitro(s)
μm	Micrômetro(s)
mm	Milímetro(s)
μM	Micromolar
Mm	Milimolar
mg	Miligrama(s)
ng	Nanograma(s)
Kg	Quilograma(s)
pmol	Picomole(s)
bp	Pares de bases
%	Porcentagem
q.s.p./	Quantidade suficiente para
km ²	Quilômetros quadrados
rpm	Rotação por minuto
'	Minutos
''	Segundos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	39
1.1	Geral	39
1.2	Específicos	39
2	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1	Considerações éticas	40
2.2	Áreas de estudo	40
2.3	Obtenção das amostras de fezes de cães	45
2.4	Exame parasitológico de fezes	48
2.5	Análise morfométrica	49
2.6	Extração e quantificação de DNA total dos sedimentos fecais	49
2.7	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	51
2.7.1	<u>Controles da PCR</u>	51
2.7.2	<u>Testes prévios para a avaliação da reprodutibilidade e sensibilidade do protocolo de PCR</u>	52
2.7.3	<u>PCR com as amostras do estudo</u>	52
2.7.4	<u>Spiking com as amostras negativas e PCR de contraprova</u>	55
2.7.5	<u>Eletroforese e visualização dos sinais de amplificação das PCRs</u>	55
2.8	Sequenciamento automático e análise dos DNAs detectados	56
3	RESULTADOS	57
3.1	Amostras obtidas	57
3.2	Exame parasitológico de fezes	61
3.3	Análise morfométrica dos ovos	67
3.4	Extração e quantificação do DNA total dos sedimentos fecais	67
3.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	68
3.5.1	<u>Reprodutibilidade do protocolo da PCR</u>	68
3.5.2	<u>Sensibilidade do protocolo da PCR</u>	68
3.5.3	<u>PCR com as amostras do estudo</u>	69
3.5.4	<u>PCR de contraprova após <i>spiking</i> com as amostras negativas</u>	71

3.6	Sequenciamento automático	71
4	DISCUSSÃO	78
	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	84
	ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido	107
	ANEXO B - Questionário das características dos pontos de coleta	110

INTRODUÇÃO

O cão, animal amplamente distribuído foi descrito por Linnaeus em 1758 como *Canis familiaris*. É um mamífero canídeo, subespécie do lobo (*Canis lupus*) e, talvez, o mais antigo animal domesticado pelo ser humano (BHAGAT, 2002).

A origem do cão doméstico baseia-se em suposições, por se tratarem de ocorrências de milhares de anos. Uma das teorias aponta para um início anterior ao processo de domesticação, sugerindo a separação do lobo há cerca de 135.000 anos, com base nos vestígios de canídeos, similares morfologicamente à do lobo cinzento, encontrados juntamente com ossadas humanas na região paleártica (WANG & TEDFORD, 2010). Evidências arqueológicas ainda são escassas, porém a maioria dos fósseis de cães data de 7.000 anos atrás (KENDALL, 2002).

Estudos atuais apontam que os humanos do Paleolítico foram provavelmente os primeiros a domesticar os cães, cerca de 33.000 anos atrás, a partir do cruzamento de lobos menos agressivos na Ásia Oriental. As descobertas desses autores sugerem uma origem comum de um único pool de genes entre todas as populações de cães. Quando compararam o DNA mitocondrial (mtDNA) de 38 lobos da Eurásia com os de 654 cães domésticos distribuídos pela Ásia, Europa, África, América e Ártico, foi verificado que a variação genética entre os cães é muito maior na China, Tailândia, Camboja, Tibet e Japão, sugerindo uma origem no Leste Asiático para o cão doméstico (SAVOLAINEN et al., 2002; OVODOV et al., 2011).

Ao longo dos séculos, através da domesticação, o ser humano realizou uma seleção artificial dos cães por suas aptidões, características físicas ou tipos de comportamentos e a relação estabelecida tornou-se uma das mais fortes “ligações humano-animal” (CARMENA & CARDONA, 2013). O resultado foi uma grande diversidade de raças caninas, as quais variam em pelagem e tamanho dentro de suas próprias raças, atualmente classificadas em diferentes grupos ou categorias. As designações *vira-lata* (no Brasil) ou *rafeiro* (em Portugal) são dadas aos cães sem raça definida ou mestiços descendentes (HARE et al., 2002).

Com a expectativa de vida variando entre dez e vinte anos, o cão é um animal social que, representa companhia para muitas pessoas e pode também contribuir com o desenvolvimento físico, social e emocional das crianças e com o bem-estar de seus proprietários, em particular de indivíduos idosos (PATRONEK et al., 1997; WONG et al., 1999; BERZINS, 2000; BENTUBO et al., 2007; PAUL et al., 2010). Possuindo excelente

olfato e audição, os cães podem ser bons caçadores, vigorosos corredores, relativamente dóceis e leais, inteligentes e com boa capacidade de aprendizagem. Deste modo, podem ser adestrados para executar um grande número de tarefas úteis, como cão de terapia, de caça, de tração, de pastoreio, de guarda, cão-guia e cães farejadores. Assim como o ser humano, também podem ser vítimas de doenças virais, bacterianas, parasitoses, depressão e mal de Alzheimer, bem como aquelas características do envelhecimento, como problemas de visão e audição, artrite e mudanças de humor (ROSSI, 2010).

O aumento da população humana habitando cada vez mais a maioria das áreas na Terra tem provocado severas modificações nos ambientes naturais. A locomoção das pessoas transportando também seus animais domésticos resulta na introdução de um número de espécies domésticas para novos habitats. A abundância de cães livres na natureza é preocupação crescente em muitos países devido ao elevado risco da predação de animais silvestres, pela hibridação com canídeos selvagens, pondo em perigo espécies raras e, por serem reservatórios em potencial de parasitos, contribuindo para transmissão de inúmeras doenças (BRICKNER, 2002; DIAZ et al., 2015).

O cão doméstico é encontrado em associação com seres humanos em todo o mundo e em uma grande variedade de habitats, sendo considerado animal de companhia. O crescente número desses animais tem estreitado o contato com o homem, aumentando inclusive a exposição humana a agentes responsáveis por zoonoses como equinococose, leishmaniose, toxocaríase, raiva, doença de Chagas, peste e outras infecções bacterianas (GENNARI et al., 1999; DOS SANTOS et al., 2002; RIBEIRO, 2004; CHOMEL & SUN, 2011; DEPLAZES et al., 2011; DIAZ et al., 2015).

Cães domésticos podem ser parasitados por muitos helmintos zoonóticos, porém, o volume de informações disponíveis sobre cada espécie é mais ou menos abundante dependendo da importância de determinado parasito para esses animais ou dos seus envolvimento com infecções humanas ou, até mesmo, com espécies domésticas exploradas comercialmente (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007; ABU-MADI et al., 2010; LEFKADITIS et al., 2014; TUN et al., 2015).

As infecções parasitárias acometem cães de todas as idades, mas usualmente, são mais prevalentes em filhotes, principalmente pelo fato de muitos parasitos utilizarem vias de transmissão que expõem especificamente recém-nascidos ou neonatos e, também, porque os animais jovens não respondem imunologicamente de forma eficaz (RAMÍREZ-BARRIOS et al., 2004).

As larvas de *Toxocara canis* (Werner, 1782), *Toxocara cati* (Schrank, 1782), *Ancylostoma caninum* Ercolani, 1859 e *Ancylostoma braziliense* Faria, 1909 podem migrar pelo parênquima pulmonar de cães que, em geral, são assintomáticos. As infecções maciças podem ocasionar lesões e reação inflamatória do parênquima pulmonar com possibilidade de infecção bacteriana secundária, exigindo tratamento antibiótico. Tosse e taquipnéia podem ser observadas em filhotes (RIBEIRO, 2004). *T. canis* e *A. caninum*, por exemplo, são os principais agentes etiológicos no homem da larva migrans visceral (LMV) e larva migrans cutânea (LMC) ou “bicho geográfico”, respectivamente (GENNARI et al., 1999; GONZÁLEZ et al., 2015) e a presença deles em cães é uma indicação indireta da ocorrência destas doenças em seres humanos em regiões endêmicas (SHARMA et al., 2015).

Os cães domésticos também são frequentemente infectados por parasitos gastrointestinais (TUN et al., 2015; TORRES-CHABLÉ et al., 2015). Da mesma forma que os próprios hospedeiros, a maioria dos parasitos de cães têm ampla distribuição geográfica. No entanto, o elenco de espécies e suas respectivas prevalências são afetados por fatores climáticos, hábitos culturais, recursos diagnósticos e nível de notificação (MCCARTHY & MOORE, 2000).

O helminto *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809), nematóide parasito do esôfago e estômago de cães, é relativamente frequente no Brasil, tendo sido descrito em cães de várias regiões do país (MENSE et al., 1992; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002; FONSECA et al., 2012). Os adultos vivem dentro de nódulos fibrosos, de vários centímetros de diâmetro nas paredes do esôfago, estômago e aorta (CURY & LIMA, 2002; GIANNELLI et al., 2014; SASANI et al., 2014). A presença de nódulos no esôfago pode levar a esofagite e o crescimento, principalmente próximos à cárdia, pode causar obstrução parcial, levando à disfagia e desconforto gástrico com regurgitação e vômitos (FREITAS, 1977; CURY & LIMA, 2002; CHIKWETO et al., 2012; VRDOLJAK et al., 2014). Esses nódulos parasitários têm sido associados ao surgimento de sarcomas esofágicos em cães (RANEN et al., 2004; FONSECA et al., 2012; NIVY et al., 2014). Os ovos de *S. lupi* ganham a luz do esôfago ou estômago por meio de pequenas fístulas nos nódulos e alcançam o meio exterior junto com as fezes dos cães (FREITAS, 1977; RIBEIRO, 2004; GIANNELLI et al., 2014; SUDAN et al., 2015).

Os helmintos adultos do nematóide *Physaloptera praeputialis* (Linstow, 1899) são hematófagos e vivem aderidos à mucosa do estômago de cães onde podem provocar erosões, levando a gastrite catarral ou hemorrágica e anemia (FREITAS, 1977; FORTES, 1987). Os helmintos adultos põem seus ovos na luz do estômago e estes alcançam o meio exterior

junto com as fezes dos seus hospedeiros (RIBEIRO, 2004; CANTÓ et al., 2011; RAMOS et al., 2013).

Infecções por helmintos adultos de *Trichuris vulpis* Frolich, 1789, nematóide do ceco e cólon, causam anemia e diarreia em cães e as lesões provocadas podem levar a infecções bacterianas secundárias (RIBEIRO, 2004). *T. vulpis* vive com a extremidade anterior fixada à mucosa e alimenta-se de líquidos tissulares, células epiteliais e sangue (CURY & LIMA, 2002). Milhares de ovos do parasito podem ser eliminados diariamente juntamente com as fezes dos cães e no ambiente, no interior dos ovos, as larvas evoluem para o seu terceiro estágio, tornando-se infectantes (RIBEIRO, 2004). Vários estudos demonstraram a presença de ovos do parasito nas fezes de cães do Brasil (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002; BLAZIUS et al., 2005; CAMPOS FILHO et al., 2008; KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; CORONATO et al., 2012; LIMA et al., 2015; OLIVEIRA-ARBEX et al., 2016).

A. caninum é um nematódeo hematófago do intestino delgado de cães. Em cães jovens, a passagem de larvas pelo leite pode ter consequências fatais ou ser responsável pela produção de quadros de anemia hemorrágica aguda ou crônica acompanhada de diarreia que pode conter sangue e muco. Em cães adultos podem causar deficiência de ferro e anemia hipocrômica microcítica (URQUHART et al., 1996). *A. braziliensis*, trata-se de uma espécie menos prevalente, cujos efeitos relacionados à hematofagia dos vermes adultos causam transtornos semelhantes a *A. caninum*. No entanto, por ser menos voraz, é também menos patogênico (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007). Os ovos de ancilostomídeos são postos na luz do intestino delgado e eliminados para o ambiente, podendo ser detectados nas fezes (MATEUS et al., 2014; TORRES-CHABLÉ et al., 2015). As fêmeas ovipõem diariamente milhares de ovos não embrionados, sendo que as de *A. caninum* põem em média 16.000 e as de *A. braziliense*, 4.000 (FREITAS, 1977; RIBEIRO, 2004).

Assim como as espécies do gênero *Ancylostoma*, *T. canis* é frequentemente encontrado no intestino delgado de cães (TORRES-CHABLÉ et al., 2015). Embora seja uma infecção frequente em animais jovens, cães adultos podem permanecer susceptíveis e contribuir para a contaminação ambiental (OVERGAAUW, 1997). Nos cães, os efeitos da infecção por *T. canis* dependem da idade do animal, do número, localização e estágio de desenvolvimento dos helmintos (PARSONS, 1987). Os adultos no intestino podem causar obstrução intestinal dos ductos colédoco e pancreático (URQUHART et al., 1996). Os ovos de *T. canis* são eliminados não embrionados junto com as fezes dos cães e no ambiente, em

condições favoráveis, as larvas evoluem no interior dos ovos até seu estágio infectante (RIBEIRO, 2004).

Dos nematóides parasitas de cães, os ancilostomídeos são os mais prevalentes (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; SPRENGER et al., 2014; LIMA et al., 2015; TORRES-CHABLÉ et al., 2015; OLIVEIRA-ARBEX et al., 2016), porém os principais cestódeos parasitos gastrintestinais de cães pertencem às famílias Dilepididae (*Dipylidium caninum*) e Taeniidae (*Taenia* sp. e *Echinococcus* sp.), sendo a maioria bastante adaptado a esses hospedeiros não lhes causando grandes transtornos (GEORGI, 1987).

D. caninum (Linnaeus, 1758) possui ampla distribuição geográfica em cães, podendo também infectar o homem. Devido à ingestão acidental de pulgas infectadas, há relatos de parasitismo por *D. caninum* em humanos, principalmente crianças, que desenvolveram quadro clínico abdominal brando e prurido anal (LLOYD, 1998; MOLINA et al., 2003; RAETHER & HÄNEL, 2003). Em geral não provoca danos graves e os cães podem tolerar centenas de vermes adultos em seu intestino delgado sem manifestarem sintomatologia. Nas infecções de alta intensidade pode ocorrer irritação da mucosa com enterite. A saída ativa da proglote pelo ânus pode causar prurido na região perianal (FREITAS, 1997). Ovos do parasito são frequentemente detectados em análises parasitológicas envolvendo amostras ambientais e fezes de cães (MATEUS et al., 2014; TORRES-CHABLÉ et al., 2015).

Diversas espécies do gênero *Taenia* Linnaeus, 1758 podem parasitar o intestino delgado de cães, como *Taenia multiceps* Leske, 1780, *Taenia hydatigena* Pallas, 1766, *Taenia ovis* (Cobbold, 1869), *Taenia pisiformis* Bloch, 1780 e *Taenia serialis* (Gervais, 1847) Baillet, 1863. O ciclo biológico envolve dois hospedeiros mamíferos, sendo um hospedeiro definitivo, o cão, e um hospedeiro intermediário, que varia, dependendo da espécie, entre bovinos, suínos, ovinos, lagomorfos ou humanos (ABBASI et al., 2003). As espécies de *Taenia* que possuem o cão como hospedeiro definitivo são pouco patogênicas para este hospedeiro, entretanto as formas larvais (metacestóides) de algumas espécies podem formar cistos em locais como fígado, pulmões e sistema nervoso central dos hospedeiros intermediários, acarretando enfermidades em animais de importância econômica ou até mesmo apresentar potencial zoonótico (ING et al., 1998; RAETHER & HÄNEL, 2003). No Brasil, foram registradas raras infecções por *T. hydatigena*, *T. taeniformis* (Batsch, 1786) e *T. multiceps*, respectivamente, em suínos (Rio Grande do Sul), gato (Mato Grosso) e ovino (Mato Grosso do Sul) (BATISTA et al., 2010; RAMOS et al., 2013; MONTEIRO et al., 2015).

À exceção de *Echinococcus granulosus* senso lato (s.l.) (Batsch, 1786), agente etiológico da equinococose cística, distribuído de forma descontínua em todos os continentes,

as demais espécies do gênero *Echinococcus* Rudolphi, 1801 têm uma distribuição mais restrita (ECKERT & DEPLAZES, 2004). Das espécies que têm o cão como hospedeiro definitivo, apenas *E. granulosus* s.l. e *Echinococcus vogeli* Rausch & Bernstein, 1972 ocorrem no Brasil e os dados sobre a infecção em hospedeiros definitivos são escassos no país (FARIAS et al., 2004; de LA RUE et al., 2011; SANTOS et al., 2012; SOARES et al., 2014).

A infecção por *E. granulosus* s.l. é comum no estado do Rio Grande do Sul, onde o cão doméstico é o principal hospedeiro definitivo e os bovinos e ovinos, os hospedeiros intermediários (FARIAS et al., 2004). O parasito *E. vogeli*, agente causador da equinococose policística, é exclusivo da região neotropical e no Brasil tem circulação relacionada à região amazônica. A maioria dos estudos evidencia o encontro da forma metacestóide em paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1758) e no homem, respectivamente, os hospedeiros intermediários, natural e acidental, do parasito (D’ALESSANDRO et al., 1981; D’ALESSANDRO & RAUSCH, 2008; NOYA-ALARCÓN et al., 2011; VIZCAYCHIPI et al., 2013; MAYOR et al., 2015; STIJNIS et al., 2015; ALMEIDA et al., 2015; DEBOURGOGNE et al., 2015).

Os cestóides mais patogênicos do hospedeiro humano são os da família Taeniidae Ludwig, 1886, quando o organismo na fase assexuada de reprodução, o metacestóide (forma larvar), desenvolve-se preferencialmente no cérebro, fígado ou pulmões. Além do metacestóide (cisticerco) da *Taenia solium* Linnaeus, 1758 envolvido na neurocisticercose, os metacestóides (cistos hidáticos) de quatro espécies do gênero *Echinococcus* Rudolphi 1801 são reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como potenciais causadoras de grave doença em humanos, a equinococose ou hidatidose (D’ALESSANDRO & RAUSCH, 2008). Essas espécies são *E. granulosus* s.l. (Batsch, 1786), que provoca a equinococose cística; *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, a equinococose alveolar; *Echinococcus oligarthrus* (Diesing, 1863) e *E. vogeli* Rausch & Bernstein, 1972 que causam a equinococose policística.

A equinococose canina mais demonstrada é a causada pelos vermes adultos das espécies *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis*, enquanto que as informações das infecções por *E. vogeli* e *E. oligarthrus* em canídeos domésticos e silvestres são provenientes de raros relatos (CABRERA et al., 1960; D’ALESSANDRO et al., 1981; SOARES et al., 2014).

E. granulosus s.l. possui distribuição ampla em países com atividades de pecuária, tendo sido introduzido nas Américas no início do século XVI. Já *E. multilocularis* ocorre em hospedeiros naturais do Hemisfério Norte (RAUSCH, 1986). As outras duas espécies, naturais da região neotropical, *E. vogeli* e *E. oligarthrus*, são consideradas simpátricas sobre

extensas áreas da América Latina, onde seus hospedeiros necessários estão presentes (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008).

Os ciclos biológicos das espécies de *Echinococcus* spp. podem ser classificados em doméstico quando o cão doméstico atua como hospedeiro definitivo ou em silvestre, quando carnívoros silvestres estão envolvidos na transmissão. Dentro dos ciclos, o papel específico das diferentes espécies hospedeiras pode variar consideravelmente entre as regiões e nas áreas onde a equinococose é endêmica, os ciclos biológicos silvestre e doméstico podem coexistir ou se sobrepor (RAUSCH, 1995).

No intestino delgado dos hospedeiros, os vermes adultos, que podem chegar até doze milímetros de comprimento, penetram profundamente entre as vilosidades das criptas de Lieberkühn associando suas ventosas e ganchos rostelares ao epitélio. Pequenas alterações podem ocorrer, tais como o achatamento local de células epiteliais, ligeira infiltração celular na mucosa e o aumento da produção de muco. Produtos de excreção/secreção podem ser liberados a partir do escólex do parasito, induzindo a produção de anticorpos na circulação (ECKERT et al., 2001a). Esta íntima relação parasito-hospedeiro normalmente não causa doença significativa nesses hospedeiros, mesmo em infecções com alta carga parasitária (CARMENA & CARDONA, 2013).

O estágio metacestóide das espécies de *Echinococcus* é encontrado intimamente nas vísceras de seus hospedeiros intermediários e, ocasionalmente, também em espécies de animais que normalmente não fazem parte do ciclo biológico habitual dos parasitos, como o homem, considerado hospedeiro acidental. Os hospedeiros intermediários naturais são tipicamente herbívoros predados pelos hospedeiros definitivos carnívoros (ECKERT et al., 2001a).

E. granulosus s.l. utiliza espécies da família Canidae como hospedeiros definitivos e sua transmissão é mantida principalmente em um ciclo sinantrópico com os cães domésticos como hospedeiros definitivos e espécies de gado (bovino/ovino) como hospedeiros intermediários (MCMANUS et al., 2003; CARMENA & CARDONA, 2013). Em certas regiões, canídeos selvagens podem estar envolvidos no ciclo biológico (JENKINS & CRAIG, 1992).

E. multilocularis é restrito ao Hemisfério Norte e seu ciclo biológico é predominantemente silvestre. Os principais hospedeiros definitivos são raposas do gênero *Vulpes* e *Alopex*, e menos frequentemente cães e gatos domésticos. Na América do Norte, os coiotes parecem ter um papel importante no ciclo e os lobos também podem estar envolvidos em determinadas regiões (RAUSCH, 1986, 1995, 1997). Populações de felídeos domésticos e

selvagens naturalmente infectadas com *E. multilocularis* foram encontradas, sugerindo que o papel zoonótico desses animais deva ser considerado frente aos hospedeiros definitivos preferenciais no contexto de regiões altamente endêmicas (UMHANG et al., 2015). Uma variedade de espécies de pequenos roedores tais como ratazanas (*Rattus* sp.), pikas (*Ochotona* sp.) e lemingues (*Lemmini* sp.) podem atuar como hospedeiras intermediárias do parasito (VUITTON et al., 2003).

Cães domésticos infectados por *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis* são a principal fonte de infecção para o desenvolvimento, respectivamente, das equinococoses humanas cística e alveolar. Ambas são importantes zoonoses que representam grandes problemas de saúde coletiva em diversas regiões do mundo, causando um prejuízo socioeconômico considerável (BUDKE et al., 2006; BENNER et al., 2010; TORGERSON et al., 2010).

Com relação às espécies neotropicais, *E. oligarthrus* foi descrito pela primeira vez em 1863 por Karl Moritz a partir de material coletado do intestino delgado de pumas (*Felis puma concolor*) (RAUSCH, 1986, 1995, 1997). O verme adulto é o menor parasito do gênero, com 2-3 milímetros de comprimento e utiliza espécies selvagens da família Felidae como hospedeiros definitivos (RAUSCH et al., 1978, 1981).

E. vogeli é o principal alvo do presente estudo, por sua endemicidade na região norte do Brasil, incluindo o estado do Acre. O parasito utiliza o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus* Lund, 1842) (Figura 1) e o cão doméstico como hospedeiros definitivos (RAUSCH, 1986, 1995, 1997). O verme adulto (Figura 2) pode chegar a 12 milímetros, desenvolvendo até 6 proglótides. *E. vogeli* e *E. oligarthrus* podem reter cerca de 90 ovos em seus úteros (RAUSCH et al., 1978, 1981).

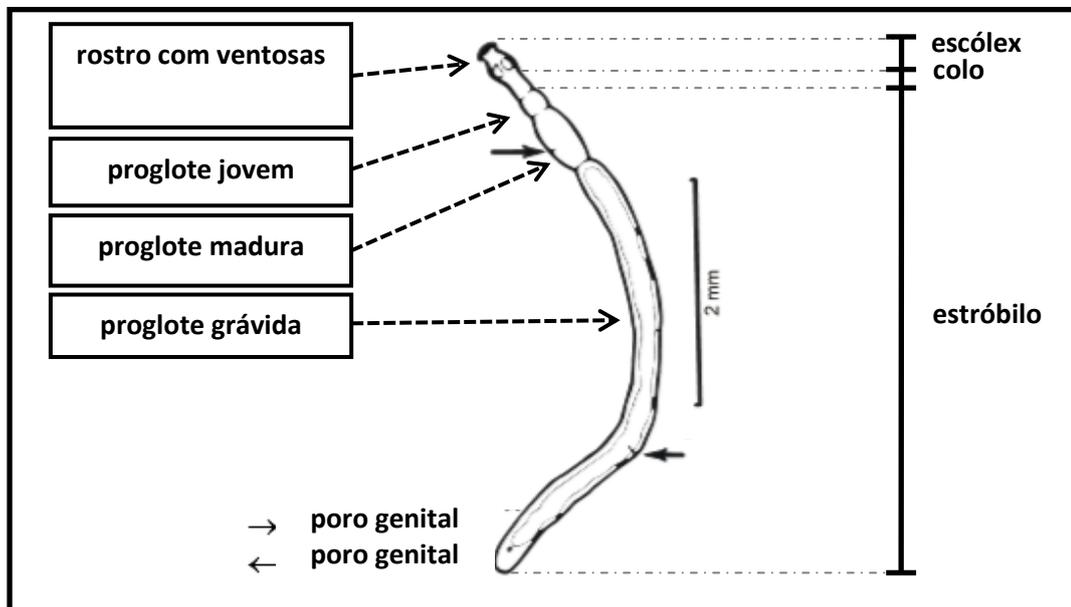
S. venaticus é um canídeo sul-americano encontrado desde o Panamá até o nordeste argentino, com exceção do Chile e Uruguai. É uma espécie rara, peculiar por sua adaptação à vida em florestas, sendo considerado semi-aquático por conseguir nadar e mergulhar com facilidade (LANGGUTH, 1975; HUSSON, 1978; DEMATTEO et al., 2011).

Figura 1 – Imagem do cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*)



Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose (SRNH-IOC/Fiocruz-RJ).

Figura 2 – Representação esquemática do verme adulto de *Echinococcus vogeli*

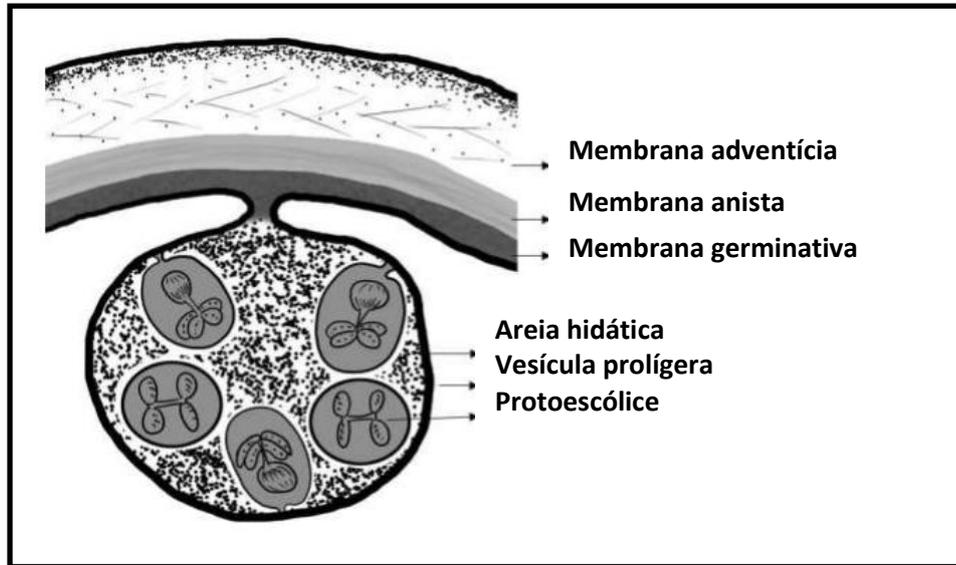


Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose (SRNH-IOC/Fiocruz-RJ).

Os cistos hidáticos (estágio metacestóide) (Figura 3) de *E. vogeli* são caracterizados como vesículas esféricas contínuas ou esporadicamente isoladas, de aspecto esbranquiçado e por vezes translúcido, com cada uma sendo capaz de albergar de 10 a 500 protoescólices do helminto. Situam-se no parênquima, sendo que a maioria fica perto da superfície,

contrastando com a coloração escura do fígado, quando estabelecidos neste órgão nos hospedeiros intermediários (D’ALESSANDRO et al., 1981; D’ALESSANDRO & RAUSCH, 2008).

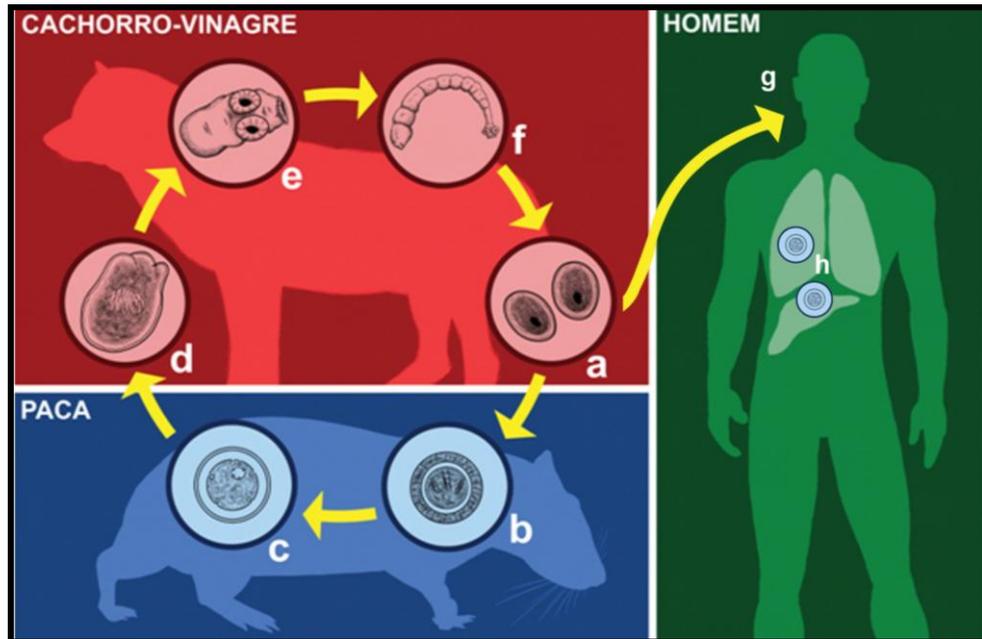
Figura 3 – Representação esquemática do metacestóide de *Echinococcus* sp.



Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose (SRNH-IOC/Fiocruz-RJ).

O ciclo biológico de *E. vogeli* (Figura 4), foi primeiramente relatado por Cabrera et al. (1960). Esses autores observaram que o cachorro-vinagre, o hospedeiro definitivo natural desse cestóide, caçava em bandos sua presa preferida, a paca (*C. paca*) (Figura 5), perseguindo-a na terra e na água. Embora o cachorro-vinagre e a paca possuam tamanhos semelhantes, um único cachorro pode às vezes ser capaz de superar esses roedores, como mostrado por Deutsch (1983). No presente, este predador é o único hospedeiro definitivo natural conhecido de *E. vogeli*, embora indivíduos da espécie *Cerdocyon thous* (graxaim) já tenham sido experimentalmente infectados. A elevada prevalência de metacestóides de *E. vogeli* em pacas é um indicativo de uma taxa muito mais elevada da presença desses helmintos nos hospedeiros definitivos, uma vez que poucos estudos envolveram a análise intestinal de cachorros-vinagre (D’ALESSANDRO & RAUSCH, 2008; SOARES et al., 2014). Os vermes adultos de *E. vogeli* aparentemente não se desenvolvem em gatos ou em outros felinos (D’ALESSANDRO et al., 1981).

Figura 4 – Representação esquemática do ciclo biológico de *Echinococcus vogeli*



Legenda: a- ovo; b- ovo ingerido pela paca; c- metacéstóide; d- ingestão de protoescólice pelo cachorro vinagre; e- escólice desvaginado; f- verme adulto; g- ingestão de ovo pelo homem; h- metacéstóides.

Fonte: Ilustração de Bruno Eschenazi do Serviço de Produção e Tratamento de Imagem – IOC/Fiocruz-RJ.

Figura 5 – Imagem da paca (*Cuniculus paca*)



Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose (SRNH-IOC/Fiocruz-RJ).

Em alguns áreas da região amazônica a caça de animais como cutias (*Dasyprocta punctata* Gray, 1842), tatus (*Dasytus novemcinctus* Linnaeus, 1758), pacas, porcos-do-mato (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) e veados-mateiros (*Mazama americana* Erxleben, 1777) é praticada como subsistência e a carne desses animais constitui a principal fonte de proteína da população dentre os animais terrestres caçados (VALSECCHI et al., 2014; MAYOR et al.,

2015). A paca inclusive está entre as espécies mais intensamente caçadas na América Latina, principalmente por causa de sua carne, cotada como a mais apreciada entre todas as de caça (VALSECCHI & AMARAL, 2009). Um estudo realizado no Acre revelou, por exemplo, que pacas, porcos-do-mato e veados-mateiros são animais que correspondem a quase 60% da biomassa abatida na Reserva Extrativista do Alto Tarauacá e que cada pessoa tinha um consumo médio anual de 51,82 kg de carne de caça (BOTELHO, 2013).

Sabe-se que a paca se apresenta como hospedeira de uma série de parasitos (NAMUE & WONGSAWAD, 1997; ITO & ITAGAKI, 2003; PARAMASVARAN et al., 2009) e estudos assinalam a infecção do metacestóide de *E. vogeli* em pacas da região amazônica colombiana (D'ALESSANDRO et al., 1981), brasileira (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008), venezulana (NOYA-ALARCÓN et al., 2011), do norte da Argentina (VIZCAYCHIPI et al., 2013) e peruana (MAYOR et al., 2015).

Além da paca, outras espécies de mamíferos das Américas Central e do Sul também são reconhecidas como hospedeiras intermediárias de *E. vogeli* e *E. oligarthrus*, destacando-se o gambá (*Didelphis marsupialis* Hegner and Ratcliffe, 1927), a cutia (*D. punctata*), a cutia cinzenta (*D. fuliginosa*, Wagler, 1832), o rato-espinho (*Proechimys semispinosus*, Allen, 1899) e os coelhos selvagens (*Sylvilagus floridanu* e *S. floridanus* Allen, 1899) (D'ALESSANDRO et al., 1981).

A equinococose policística humana causada por *E. vogeli* é uma doença naturalmente endêmica de algumas regiões da América do Sul e América Central. A doença ocorre predominantemente em áreas rurais onde as populações, geralmente, possuem cães domésticos, desenvolvem atividades de caça e possuem baixo nível sócio-econômico e cultural (D'ALESSANDRO, 1997). A transmissão peridomiciliar é a principal e ocorre quando os cães domésticos são alimentados com as vísceras cruas de pacas e contaminam o ambiente peridomiciliar com os ovos do parasito junto de suas fezes (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008).

No final da década de 1970 a doença humana foi reconhecida, quando foram relatados 13 casos humanos englobando os países Colômbia, Equador e Panamá (D'ALESSANDRO et al., 1979). Os principais sinais e sintomas clínicos são dor abdominal, icterícia, hepatomegalia, perda de peso, febre e aumento da massa abdominal em função do estabelecimento e crescimento dos cistos hidáticos no fígado, o que ocorre na maioria dos casos (MENEGHELLI et al., 1992; SIQUEIRA et al., 2013).

De acordo com informações publicadas por Rausch & D'Alessandro (2002), 99 casos humanos de equinococose policística foram diagnosticados em 11 países, incluindo a região

da Nicarágua, na América Central e o Chile, Argentina e Uruguai, na América do Sul (D’ALESSANDRO, 1997; RAUSCH & D’ALESSANDRO, 2002). Dos 72 casos diagnosticados, em agosto de 1996, por exemplo, a maioria era do Brasil (24 casos), Colômbia (16 casos), Equador (11 casos), e Argentina (11 casos). Além disso, de 1 a 3 casos esporádicos foram identificados ainda em outros sete países (D’ALESSANDRO, 1997).

Até março de 2007, o número total de casos conhecidos de equinococose policística era de 172. Além disso, dois estudos sorológicos no Brasil demonstraram que 41 de 1064 e 19 de 40 pessoas (total de 60 de 1104) apresentaram anticorpos anti-*Echinococcus* detectados no teste de contraímuno eletroforese. Não é conhecido se todas essas 60 pessoas (5% de 1104) tiveram equinococose confirmada, porém, parece lógico considerar que algumas dessas pessoas provenientes de áreas onde a infecção é endêmica podem ter tido infecções assintomáticas por *E. vogeli*. Sendo assim, o número de pessoas infectadas nos países neotropicais seria de 232, com 160 casos somente no Brasil (PASTORE et al., 2003a). Quarenta casos brasileiros da ocorrência de equinococose policística nos estados do Pará e Amapá, região da Amazônia Ocidental, foram resumidos por Soares et al. (2004). Dados prévios demonstraram a ocorrência de casos clínicos de equinococose policística e indivíduos com sorologia positiva em áreas urbanas e rurais do município de Sena Madureira no Acre (PASTORE et al., 2003a,b). Fatores epidemiológicos associados com a vida destes indivíduos, como o histórico de caça para subsistência e o hábito da alimentação de cães domésticos com vísceras cruas de pacas, são uma realidade da região (MENEGHELLI et al., 1986; SIQUEIRA et al., 2007, 2013).

Atualmente o número de casos humanos é desconhecido, porém, são reconhecidos mais de 200 casos em 12 países da América do Sul tropical. Especialistas acreditam que os casos publicados, representem, provavelmente, apenas uma pequena proporção do número real e que a infecção seja atualmente mais comum, estando subdiagnosticada (OOSTBURG et al., 2000; D’ALESSANDRO & RAUSCH, 2008).

Casos de equinococose policística, sem dúvida, muitas vezes escapam do diagnóstico e as significativas morbidade e mortalidade são as consequências (D’ALESSANDRO & RAUSCH, 2008). A doença ainda é pouco associada a *E. oligarthrus* em função do pequeno número de casos humanos registrados nas regiões endêmicas (MORO & SCHANTZ, 2009). Dos quatro casos humanos conhecidos, três descreveram a localização ocular do metacéstóide do parasito em humanos da Venezuela (LOPERA et al., 1989), Suriname (BASSET et al., 1998) e Brasil (SOARES et al., 2013). O outro caso humano, demonstrou a presença do

metacestóide de *E. oligarthrus* na parede do ventrículo esquerdo de um brasileiro, após a autópsia (D'ALESSANDRO et al., 1995).

A infecção de seres humanos com ovos de *Echinococcus* sp. pode ocorrer nos ambientes silvestre e domiciliar como resultado da manipulação dos hospedeiros definitivos infectados ou de fezes contendo ovos, além de plantas ou solos contaminados com ovos (SZOSTAKOWSKA et al., 2014), seguidos pela transferência direta dos ovos à boca por mãos e alimentos contaminados. Ovos de *Echinococcus* sp. podem se aderir ao pelo dos cães (NOSIK, 1952), em particular em torno do ânus, nas coxas e sobre as patas (MATOFF & KOLEV, 1964). Estudos da década de 90 na República Popular da China (Sichuan) já demonstravam que pessoas que bebem água de pequenas valas acessíveis aos animais têm um risco maior de adquirir infecção por *E. granulosus* s.l. do que as que consomem água de poço (LIU, 1993). A ingestão de legumes, saladas, frutas cruas e outros vegetais contaminados com ovos de *Echinococcus* sp. também pode resultar em infecção (LIU, 1993; LASS et al., 2015). Um estudo utilizando 103 alimentos coletados de florestas, plantações e hortas da província de Várnia-Masúria na Polônia demonstrou a presença de ovos de *E. multilocularis* em 23,3% das amostras, dentre frutas, legumes e cogumelos (LASS et al., 2015).

A infecção de primatas e ariranhas com ovos de *E. vogeli* eliminados juntamente com as fezes de cachorros-vinagre em um zoológico norte-americano, sinalizou que os visitantes humanos e outros animais estavam sob risco (HOWARD & GENDRON, 1980). Assim, canídeos importados de áreas onde a doença é endêmica podem ser fontes de infecção quando são mantidos como animais de estimação (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008). Cães vadios em áreas urbanas também apresentam perigo para os seres humanos por já terem sido relatados com *E. granulosus* s.l., embora com uma incidência menor do que o descrito para regiões rurais de Dom Pedrito em Rio Grande do Sul (HOFFMANN et al., 2001).

Embora a equinococose seja essencialmente propagada por hospedeiros definitivos, à persistência do ciclo de vida dos parasitos está ligada à durabilidade dos ovos no ambiente, principalmente os de *E. granulosus* s.l. e *E. vogeli* em se tratando de infecções disseminadas por cães domésticos no domicílio ou em locais onde os cães vadios são a maioria (CHAÂBANE-BANAOUES et al., 2015). Quando em ambiente adequado, úmido e com temperaturas mais baixas, os ovos permanecem infectantes por cerca de um ano depois de terem sido depositados sobre o solo, mesmo sob diferentes condições climáticas (SANCHEZ-THEVENET et al., 2005). Por outro lado, a dessecação e elevadas temperaturas são os dois fatores mais importantes para a redução da longevidade no ambiente (GEMMELL, 1968; LAWS, 1968; GEMMELL & LAWSON, 1986; VEIT et al., 1995; ECKERT et al., 2001b).

Estudos que avaliem a resistência e viabilidade dos ovos de *E. oligarthrus* e *E. vogeli* no ambiente tornam-se necessários, porém já foi demonstrado que ovos de *E. multilocularis* permaneceram viáveis cerca de 16 meses em água a 4°C (VEIT et al., 1995).

A inativação de ovos de *Echinococcus* sp. pode ser realizada com água ou calor seco fervente. Assim como os ovos de *Taenia* sp., os de *E. granulosus* s.l. são inativados dentro de 5 minutos entre 60°C e 80°C e rapidamente a 100°C (ECKERT et al., 2001b). Já o período de tempo durante o qual os materiais contaminados devem ser aquecidos pode variar. Por exemplo, o calor penetra nas fezes de cães lentamente e tal material deve ser fervido por pelo menos 5 minutos para assegurar a inativação de todos os ovos (GEMMELL, 1968).

A maior parte dos processos de tratamento de águas residuais (por exemplo, sedimentação) não elimina totalmente os ovos de tenídeos (ECKERT et al., 2001b). Com base em experiências com os ovos de *Ascaris*, pode-se presumir que os ovos de *Taenia* sp. e *Echinococcus* sp. são inativados nas lamas de depuração e decomposição após exposição durante pelo menos 30 minutos a temperaturas de 65°C ou superior, geradas pelos processos de aquecimento ou de fermentação (ECKERT et al., 2001b).

Por outro lado, estudos mostraram que ovos de *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis* são altamente resistentes a temperaturas negativas e as temperaturas de -18°C a -20°C do congelador são insuficientes para inativar os ovos dentro de um prazo razoável. No entanto, as temperaturas de -70°C a -80°C são capazes de inativar os ovos de *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis* dentro de 96 e 48 horas, respectivamente. Para a inativação, as temperaturas eficazes tem que atingir todas as partes do material contaminado. Por exemplo, carcaças de raposas têm de ser congeladas a -80°C durante pelo menos quatro dias (de forma rotineira, por sete dias), a fim de alcançar completa ultracongelação. A elevada resistência ao frio dos ovos de *E. multilocularis* está bem documentada. Por outro lado, ainda não é claro se *E. oligarthrus*, *E. vogeli* e os genótipos de *E. granulosus* s.l. podem diferir em diferentes regiões no que diz respeito à resistência ao frio dos seus ovos (ECKERT et al., 2001b).

Os ovos de *Echinococcus* sp. também são sensíveis à dessecação. Em umidade relativa de 25%, os ovos de *E. granulosus* s.l. foram inativados dentro de quatro dias e de 0%, em apenas um dia (LAWSON & GEMMELL, 1983). Os ovos de *E. multilocularis* perderam a infectividade para roedores após exposição durante dois dias a 25°C e umidade relativa de 27%. O mesmo aconteceu quando expostos durante duas horas a 43°C e 15% de umidade relativa, e, durante 3 horas a 45°C e 85% a 95% de umidades relativas (VEIT et al., 1995).

É um consenso que a eliminação de ovos de *Echinococcus* sp. nas fezes dos cães domésticos parece ser a fonte de risco mais comum para as pessoas. Tornam-se necessários

mais estudos que visem demonstrar a contaminação ambiental por esses ovos (SZOSTAKOWSKA et al., 2014; LASS et al., 2015) e programas que promovam a educação das populações em risco. O risco de adquirir equinococose é passível de ser reduzido de acordo com a forma de como os cães são mantidos (RAUSCH, 2003), mas a antiga associação mais íntima entre pessoas e seus cães só será interrompida provavelmente mediante a exigência excepcional de mudanças no estilo de vida (RAUSCH, 2003; D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008).

Programas de controle são comuns em áreas endêmicas de equinococose cística e utilizam estratégias que interrompem o ciclo biológico de *E. granulosus* s.l., com resultados bem-sucedidos em muitos países (FARIAS et al., 2004). Estes programas envolvem o diagnóstico nos hospedeiros definitivos e o tratamento com anti-helmíntico (MACPHERSON et al., 1984; SANTILLÁN, 1999). Praziquantel, utilizado na dosagem de 5 mg/kg é um anti-helmíntico 100% eficaz contra a forma adulta de *Echinococcus* sp., porém sem propriedades ovicidas (THAKUR et al, 1978; ECKERT et al., 1984).

Farias et al. (2004) sugerem que um programa de controle com o objetivo de reduzir o impacto da equinococose nos seres humanos ou animais deve ser contínuo ou pelo menos existente, até as informações sobre a transmissão serem claras e completamente compreendidas por todas as pessoas envolvidas.

Em 1982 no Chile, um programa de controle de escala nacional desenvolvido para a equinococose cística foi desenvolvido com sucesso, porém, a descentralização do programa em 1997, juntamente com a redução da intervenção anti-helmíntica profilática em cães levou ao recrudescimento da doença no país (LARRIEU & ZANINI, 2012).

Um exemplo de programa de controle bem-sucedido desde a sua criação em 1992 foi o modelo uruguaio, em que os cães são tratados com praziquantel 12 vezes por ano e as taxas de equinococose canina foram reduzidas para 0,7% em 1997 (LARRIEU & ZANINI, 2012). A tentativa de erradicação da doença no país ainda se mantém, com os proprietários recebendo informações contínuas sobre a equinococose, porém, desde então (1997), a ausência de novos dados epidemiológicos sobre a prevalência canina, torna desconhecido o estado atual da infecção no Uruguai (CARMENA & CARDONA, 2013).

Na tentativa de estabelecer um programa de controle da equinococose, Farias et al. (2004) administraram praziquantel (Droncit®-Bayer, S. Paulo, Brasil - dosagem de 5 mg/kg) para tratamento terapêutico e profilático de *E. granulosus* s.l. em cães de Santana do Livramento no estado do Rio Grande do Sul. O esquema terapêutico foi realizado a cada trinta dias durante oito meses, resultando na interrupção eficiente da transmissão parasitária. Porém,

pelo fato do projeto não ter sido contínuo, a reincidência das infecções nos cães foi marcante quatro meses após a realização do último do tratamento.

A comprovação microscópica da infecção por *Echinococcus* sp. em fezes de canídeos é limitada pois os ovos são morfológicamente indistinguíveis entre as espécies do gênero e as espécies de *Taenia* (DINKEL et al, 1998). Outro aspecto a ser considerado é a eliminação frequentemente irregular de ovos nas fezes desses hospedeiros (ECKERT et al., 2001a). Os ovos podem ser detectados em amostras fecais utilizando-se técnicas de exames parasitológicos de rotina, como a sedimentação espontânea (HOFFMAN et al., 1934), ou mesmo diretamente sobre a pele perianal com fita adesiva transparente, a qual é pressionada na pele, transferida para uma lâmina e examinada ao microscópio (ECKERT et al., 2001a).

A técnica de raspagem intestinal (IST), com sensibilidade máxima de 78% (ZHANG et al., 2003) ainda é o método padrão ouro para a detecção da infecção em hospedeiros definitivos e baseia-se na investigação do intestino do animal morto, identificação visual e contagem, sob o microscópio estereoscópio, dos vermes adultos com base em suas características morfológicas (DINKEL et al., 1998; ECKERT, 2003; DUSCHER et al., 2005; TACKMANN et al., 2006; BEIROMVAND et al., 2011; BARNES et al., 2012; CARMENA & CARDONA, 2013; MAAS et al., 2014). Até o final da década de 1980, a IST era a única metodologia confiável para o diagnóstico da infecção intestinal por *Echinococcus* sp. em hospedeiros definitivos. Esta técnica, porém, sempre foi considerado um método de diagnóstico caro, trabalhoso e de alto risco biológico, não podendo ser recomendada para verificação de animais domésticos vivos (ZHANG et al., 2003).

Atualmente, o diagnóstico da infecção por *Echinococcus* sp. em canídeos ainda conta com a detecção parasitológica de vermes adultos após a morte e necropsia (MAAS et al., 2014), ou após a administração do purgativo arecolina em animais vivos (de LA RUE et al., 2011; BOUFANA et al., 2013). Ambas as metodologias permitem a contagem dos helmintos eliminados, a estimativa das cargas parasitárias nos hospedeiros e são fontes de materiais para estudos moleculares, porém, são consideradas de difícil utilização em estudos epidemiológicos de grande escala, por serem laboriosas, biologicamente perigosas e sensibilidade insuficiente (ALLAN et al., 1992; CARMENA & CARDONA, 2013).

A aplicação de arecolina, principal alcalóide da noz de areca (semente da *Areca catechu*), em cães e o exame do material fecal após a purgação apresenta a vantagem do aumento da probabilidade dos vermes serem expulsos, mesmo em situações de baixa carga parasitária, quando a expurgação consegue ser induzida. Sendo um fármaco bromidrato parassimpatomimético, acaba tendo uma importante ação sobre o músculo liso do intestino

delgado promovendo expurgação, com os vermes podendo ser transportados com o material eliminado (ECKERT et al., 1984). Para esta atividade, o fármaco deve ser administrado por via oral e as doses variam entre 1,75 mg/kg e 3,5 mg/kg do peso corporal, sendo adequadas para a maioria dos cães. Dobrar ou reduzir para metade a dosagem não aumenta a eficácia, mas a primeira situação pode causar vômitos (ECKERT et al., 2001a).

A arecolina pode ser administrada na forma de comprimido ou em forma líquida, mas o teste apresenta sérias desvantagens, como demonstrado em um estudo tunisiano, em que apenas 68% dos 118 cães expurgaram os helmintos após uma primeira dose e em 12% dos cães, a expurgação não aconteceu mesmo depois de uma segunda administração (SCHANTZ, 1997). No mesmo estudo, apenas 65% dos 46 cães infectados foram detectados positivos após a única administração e 78% depois de uma segunda dose de arecolina (SCHANTZ, 1997). Mortes ocasionais já foram relatadas após a penetração de pedaços afiados de ossos da dieta no intestino e o teste de arecolina não é recomendado em cadelas grávidas, cães idosos ou filhotes (ECKERT et al., 1984). Substituir esta droga por um purgante menos traumático seria altamente desejável (BARNES et al., 2012).

Schantz (1997) descreve que a visualização da eliminação da forma adulta dos helmintos em resposta a ação da arecolina, pode ser explorada com fins educativos para a população na comprovação da infecção dos cães pelo parasito.

Quanto aos ensaios de imunodiagnóstico, os testes *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e contraímunoelctroforese desenvolvidos para detecção de anticorpos no soro dos canídeos demonstram sensibilidade altamente variável (entre 40 a 90%) e a reatividade cruzada com outras espécies de parasitos é frequentemente detectada (GASSER et al., 1988, 1992, 1994; BENITO et al., 2006; ANANDA & D' SOUZA, 2015).

Os ensaios de detecção de copro-antigenos (DNA e proteínas) desenvolvidos e aprimorados recentemente são os mais apropriados e relativamente mais práticos para o diagnóstico de infecção por *Echinococcus* sp. em canídeos. Apesar de possuírem limitações de sensibilidade, são específicos pelo menos para a detecção do gênero *Echinococcus* (ALLAN et al., 1992).

Duas técnicas para o diagnóstico de infecções de *Echinococcus* em carnívoros vivos foram introduzidas e aprimoradas (ECKERT et al., 2001a) e tem tido um impacto importante em estudos epidemiológicos e, mais recentemente, sobre a vigilância durante os programas de controle da equinococose (CRAIG et al., 2015). Uma delas, baseia-se na detecção de proteínas copro-parasitárias ou coproantígenos (CA), por ensaio imunoenzimático (CA-

ELISA) e a outra, na detecção de moléculas de DNA, por meio de PCR (copro-PCR ou copro-DNA), em amostras de fezes de animais.

A CA-ELISA é baseada na utilização de anticorpos policloniais contra antígenos somáticos (ALLAN et al., 1992), antígenos de secreção/excreção de proglótides (DEPLAZES et al., 1992) ou antígenos de metacestóides (BENITO & CARMENA, 2005) para a detecção dessas moléculas em amostras fecais. A metodologia, porém, não é capaz de diferenciar entre as espécies do gênero de *Echinococcus* (ECKERT et al., 2001a). Quando a carga parasitária é maior do que 50 helmintos, o método possibilita uma detecção gênero-específica com especificidade em torno de 97%. No entanto, a sensibilidade é relativamente limitada, resultando, por exemplo, numa média em torno de 60% para infecções naturais por *E. granulosus* s.l. em canídeos (ALLAN et al., 1992; JENKIS et al., 2000). Reação cruzada entre *E. granulosus* s.l. e *T. hydatigena* pode ocorrer em abordagens diagnósticas por CA-ELISA (DEPLAZES et al., 1992).

Siavashi et al. (2006) utilizaram a CA-ELISA para a detecção da equinococose canina em três províncias iranianas relatando uma especificidade e sensibilidade do método de 74% e 72%, respectivamente. Zare-Bidaki et al. (2009), utilizando a mesma metodologia em amostras de fezes de canídeos de Moghan Plain no Irã, encontraram 21,6% infectados com *Echinococcus* sp. A CA-ELISA também já foi aplicada para diagnosticar ou excluir a infecção por *E. multilocularis* em gatos, usando amostras fecais frescas ou previamente congeladas a -20°C (DEPLAZES & ECKERT, 1996; DEPLAZES et al., 1999).

Vários estudos comparando CA-ELISA e a purgação com arecolina recomendam o uso do método enzimático devido a variações na eficácia da purgação (WACHIRA et al., 1990; CRAIG et al., 1995; RUIZ et al., 1995; SCHANTZ, 1997).

Farias et al. (2004) demonstraram índices de infecção distintos na análise de amostras de fezes de cães de áreas rurais de Santana do Livramento (RS). Em análise realizada antes do tratamento com anti-helmíntico, foram detectados 11,36% e 27,69% de cães parasitados, com a utilização, respectivamente, de purgação com arecolina e a CA-ELISA. Índices discrepantes também foram encontrados em nova avaliação realizada quatro meses após o término do tratamento, sendo observados 36,84% e 47,37% de cães infectados com a utilização de purgação e CA-ELISA, respectivamente.

Embora os testes que utilizem coproantígenos facilitem o rastreio em larga escala em hospedeiros definitivos e por isso devam ser considerados (DEPLAZES et al., 1994; MORO et al., 1999), as necessidades de maior sensibilidade de detecção e da detecção específica da

espécie envolvida levou ao desenvolvimento de uma reação em cadeia da polimerase (copro-PCR) para esta finalidade.

O teste copro-PCR envolve a concentração de ovos a partir de materiais fecais, extração de DNA e a identificação de sequências-alvo específicas da espécie, utilizando primers de DNA. As sequências-alvo são freqüentemente direcionadas para os DNAs ribossômico e mitocondrial, onde geralmente há um alto nível de heterogeneidade genética e mutação dentro dessas sequências, aumentando a presença de determinantes específicos de espécie (CRAIG & PAWLOWSKI, 2002).

O primeiro método baseado em PCR para a detecção de DNA de *Echinococcus* sp. em amostras fecais, foi desenvolvido por Bretagne et al. (1993), para a detecção de *E. multilocularis* em raposas sendo, posteriormente, modificado e melhorado (MATHIS et al., 1996; DINKEL et al., 1998). A PCR realizada no estudo mostrou uma especificidade de 100% e sensibilidade média de 89%, variando de 78% a 100%, influenciadas pela carga de helmintos (DINKEL et al., 1998). Outros ensaios copro-PCR altamente sensíveis e específicos foram desenvolvidos para a detecção de *E. multilocularis* no rastreamento da infecção em raposas em estudos epidemiológicos (VAN DER GIESSEN et al., 1999). O método é recomendado por Dinkel et al. (1998) como um alternativo à IST.

Mathis et al. (1996) realizaram tanto a extração de DNA de ovos de tenídeos quanto a PCR de acordo com o descrito por Bretagne et al. (1993), porém introduziram uma modificação para o isolamento dos ovos de amostras fecais. Realizando uma combinação de clivagem sequencial com um entre-passo de flutuação em solução de cloreto de zinco, os ovos oriundos de grandes volumes de amostra puderam ser concentrados em poucos microlitros de líquido e detectados por meio de microscópio invertido. A especificidade da PCR foi de 100% para *E. multilocularis* e a sensibilidade geral foi de 94% conforme determinado pela necropsia do intestino delgado de 55 raposas analisadas.

Sequências de DNA repetidas de forma consecutiva (em tandem) no genoma foram identificadas como alvos úteis para o diagnóstico por PCR, devido à sua elevada abundância e um potencial grau de especificidade. Essas sequências foram previamente identificadas para a utilização em *Schistosoma* spp. Weinland, 1858 (HAMBURGER et al., 1991, 1998, 2001) e em outros helmintos, como *Fasciola* spp. Linnaeus, 1758 e *Taenia* spp. (MC REYNOLDS et al., 1986; GONZALEZ et al., 2000).

Abbasi et al. (2003) pesquisaram as sequências em tandem utilizando o genótipo G1 de *E. granulosus* s.l. isolado de ovelhas, considerado o mais comum e o principal envolvido em infecções humanas (CUCHER et al., 2015). Embora com uma menor sensibilidade, os

iniciadores desenvolvidos para a sequência repetitiva EgG1 Hae III identificada no estudo, também amplificaram o DNA de protoescólices de *E. granulosus* s.l. de isolados de cavalo, camelo, bovino e de cistos hidáticos de cabra, demonstrando diferentes padrões de bandas. A elevada sensibilidade do ensaio foi demonstrada quando a positividade na PCR ocorreu para 1 fentograma de DNA extraído a partir de fezes enriquecidas com um único ovo de *Echinococcus*. A elevada especificidade do teste foi demonstrada pela ausência de sinais de amplificação quando estavam presentes 10 nanogramas de DNA de *E. multilocularis*, três espécies de *Taenia* e *D. caninum*, assim como com o DNA de *Mesocestoides* sp. e *T. canis*.

Para *E. granulosus* s.l., o diagnóstico da infecção em canídeos baseando-se na PCR, dependeu da identificação de sequências alvo adequadas para uma amplificação com elevada sensibilidade e especificidade. Primeiramente, iniciadores ou primers com base no gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (*cox 1*) foram desenvolvidos para a identificação de ovos de *E. granulosus* s.l. isolados de amostras ambientais (CABRERA et al., 2002). Outros estudos também utilizaram a copro-PCR associada ao gene *cox 1* com a mesma finalidade analisando fezes de cães do Japão (NONAKA et al., 2009) e da Lituânia (BRUZINSKAITE et al., 2009).

Inúmeros trabalhos utilizaram a copro-PCR para a identificação de *Echinococcus* em estudos epidemiológicos realizados com canídeos da Argentina (SORIANO et al., 2010), Canadá (HIMSWORTH et al., 2010a,b), China (WANG et al., 2010; VANISCOTTE et al., 2011), Iran (BEIROMVAND et al., 2011), Kosovo (SHERIFI et al., 2011), Suíça (NAGY et al., 2011) e França (UMHANG et al., 2012). Chaâbane-Banaoues et al. (2015), por exemplo, utilizaram a copro-PCR para a detecção de *E. granulosus* s.l. em amostras fecais de canídeos recolhidas do ambiente em oito diferentes regiões da Tunísia, encontrando índices de infecção entre 8,3% a 41,3% dependendo da região. Al-Jawabreh et al. (2015), utilizando a mesma metodologia em amostras de cães domésticos na Palestina, encontraram o índice de 18% de infecção com *E. granulosus* s.l. Laurimaa et al. (2015), utilizando também a copro-PCR em dois estudos diferentes na Estônia, obtiveram os índices de infecção de 7,1% para *E. multilocularis* em amostras de fezes de raposas e 2,2% para *E. granulosus* s.l. em fezes de cães urbanos.

Estudos com abordagens moleculares envolvendo o diagnóstico de *E. vogeli* em fezes de canídeos são inexistentes. Na América do Sul, somente dois trabalhos no Brasil indentificaram o parasito em seu hospedeiro definitivo natural, porém, caracterizaram o material genético de vermes adultos coletados diretamente do intestino delgado de dois cachorros-vinagres da Ilha do Marajó no Pará (SANTOS et al., 2012; SOARES et al., 2014).

A genotipagem de isolados de *Echinococcus* sp. tem se mostrado ser de suma importância devido à diferença nos ciclos biológicos, padrões de transmissão do parasito, a susceptibilidade do hospedeiro a diferentes genótipos, diferentes quadro clínicos em termos do tamanho dos cistos e gravidade, bem como a distribuição geográfica de cada espécie ou genótipo (MCMANUS & BOWLES, 1996; GROSSO et al., 2012; AL-JAWABREH et al., 2015).

O fato das mitocôndrias possuírem DNA próprio, possuírem taxas de evolução relativamente rápidas com herança exclusivamente materna e pela característica do mtDNA não sofrer recombinação, se tornaram úteis para discriminação de organismos intimamente relacionados (MCMANUS & BOWLES, 1996; MCMANUS & THOMPSON, 2003). Sequências curtas de mtDNA podem ser úteis para distinguir indivíduos de espécies diferentes, incluindo helmintos (HAJIBABAEI et al., 2007). O gene mitocondrial codificador da citocromo c oxidase subunidade 1 (*cox 1*), por exemplo, é bastante utilizado em análises moleculares por PCR com o intuito de detectar e identificar as variantes genéticas existentes nas espécies do gênero *Echinococcus*, porém, o sequenciamento automático sempre complementa esses protocolos utilizados (BOWLES et al., 1992; BART et al., 2006; UTUK et al., 2008; BRUZINSKAITE et al., 2009; NONAKA et al., 2009; SORIANO et al., 2010; de LA RUE et al., 2011; XHAXHIU et al., 2011; MA et al., 2012; PARSAN et al., 2012; SANTOS et al., 2012; CUCHER et al., 2015);

Um novo protocolo de PCR utilizando o gene mitocondrial codificador da subunidade 12S do rRNA mostra-se com promissoras sensibilidade e especificidade, respectivamente, para a detecção e diferenciação entre os isolados de *Taenia* sp. e *Echinococcus* sp., além de conter alvos polimórficos suficientes para a determinação das espécies de *Echinococcus*, sem a dependência do sequenciamento automático subsequente (ROELFSEMA et al., 2016).

A taxonomia do gênero *Echinococcus* vem sofrendo inúmeras alterações ao longo das últimas décadas, já que novos dados moleculares e epidemiológicos vêm fornecendo evidências para a designação de espécies que antigamente eram reconhecidas como linhagens (BOWLES et al., 1992; NAKAO et al., 2007; SANTOS et al., 2012; ROMIG et al., 2015). São aceitas atualmente outras espécies para o gênero *Echinococcus* diferentemente das quatro espécies reconhecidas pela OMS (MORO & SCHANTZ, 2009; SAARMA et al., 2009; ROMIG et al., 2015).

Diferentemente de *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* e *E. vogeli*, *E. granulosus* é considerada uma única espécie com altas diversidades genotípica e fenotípica, sendo denominada atualmente de *E. granulosus* sensu lato e reconhecida como um conjunto de

espécies crípticas, que diferem consideravelmente em morfologia, desenvolvimento, especificidade de hospedeiro (incluindo infectividade e patogenicidade para o ser humano) e outros aspectos (SANTOS et al., 2012). Esta diversidade também se refletiu nos genomas mitocondriais e nucleares e levou à construção de árvores filogenéticas e hipóteses sobre a origem e dispersão geográfica dos vários táxons. Com base em características fenotípicas e sequências de genes, *E. granulosus* sensu lato (s.l.) foi subdividida atualmente em *E. granulosus* sensu stricto (s.s.) (composta pelos genótipos anteriormente identificados como variantes G1, G2 e G3), *E. felidis* (a antiga “linhagem de leão”), *E. equinus* (a “linhagem de cavalo”, genótipo G4), *E. ortleppi* (a “linhagem do gado”, genótipo G5) e *E. canadensis* (composta pela “linhagem do camelo”, genótipo G6, a “linhagem do porco”, genótipo G7 e duas “linhagens de cervídeos”, genótipos G8 e G10) (MORO et al., 2009; SAARMA et al., 2009; ROMIG et al., 2015).

Com relação à caracterização molecular do material genético de metacestóides de *E. vogeli* e *E. oligarthrus*, o único estudo brasileiro utilizou 42 amostras obtidas de hospedeiros intermediários, entre pacas, cutias, tatus e isolados humanos, da região Amazônica do Brasil. Essa abordagem de Santos et al. (2012) envolveu a detecção por PCR e análise por sequenciamento dos amplicons obtidos utilizando marcadores mitocondrial (*cox 1*) e nucleares (Ag4 – maleato desidrogenase; Eg10 e P-29 – antígenos; ERK- quinase reguladora de sinal extracelular; Ir – receptor para insulina; e TGF – fator de crescimento e transformação). Os resultados demonstraram um alto grau de diferenciação entre as duas espécies e entre as espécies *E. granulosus* s.l., *E. multilocularis* e *E. ortleppi* utilizadas na comparação. Não foi detectada porém, variabilidade genética entre os isolados de *E. oligarthrus* (n=4) e a variabilidade entre os isolados de *E. vogeli* (n=38) foi considerada baixa.

No estado do Acre muitas pessoas habitam áreas isoladas que são de difícil acesso, onde a carne de animais silvestres, incluindo a da paca é frequentemente consumida como fonte de proteína, dentre os animais terrestres caçados.

Nesse contexto, o homem ao ir à caça e retornar, comumente desenvolve o hábito de alimentar seus cães com as vísceras cruas da paca abatida. As vísceras da paca que apresentam cistos hidáticos podem propiciar a infecção do cão, que, por sua vez, pode contaminar o ambiente domiciliar por meio de ovos de *E. vogeli* eliminados com suas fezes e criar condições para o desenvolvimento da equinococose policística humana.

A análise coproparasitológica de cães domésticos que são alimentados regularmente com alimento proveniente de caça pode ser considerada um bom indicador da contaminação

do ambiente, sobretudo o peridomiciliar. Verificar o papel dos cães domésticos no elo entre à infecção humana e o ciclo natural que envolve *E. vogeli*, o cachorro-vinagre e a paca, não somente servirá de alerta para a possibilidade do desenvolvimento da doença no homem mas também poderá contribuir para o direcionamento de ações de intervenção, como orientações que levem a prevenção, diagnóstico, tratamento e acompanhamento por parte dos órgãos competentes.

Aplicações de metodologias moleculares para a avaliação da infecção por *E. vogeli* em cães domésticos são inexistentes na literatura. Quando se refere a *Echinococcus* sp. e a análise fecal de cães domésticos do Brasil como um todo, os estudos com abordagens moleculares são escassos até mesmo nos locais onde *E. granulosus* s.l. é considerado endêmico.

A utilização da reação em cadeia da polimerase para a detecção de DNA de *Echinococcus* nas fezes dos cães das áreas de estudo (juntamente com o sequenciamento dos DNAs detectados) agrega maior fidedignidade ao diagnóstico, pois além da avaliação qualitativa, permite também a distinção entre as espécies do gênero *Echinococcus* e as espécies de *Taenia*, contribuindo para estudos que venham analisar a estrutura dos DNAs detectados e as possíveis variações existentes entre os materiais genéticos identificados. A possibilidade do diagnóstico diferencial entre as espécies do gênero *Echinococcus* também é um aspecto importante a ser considerado, uma vez que, os agentes ainda não descritos nas áreas de estudo podem ser identificados.

A análise de material biológico obtido de cães, mantendo os animais com vida e sem administração de purgativos, foram vantagens adicionais consideradas na elaboração da metodologia do presente estudo.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Analisar fezes de cães domésticos (*Canis familiaris*) do estado do Acre quanto a presença de DNA de *Echinococcus* sp. utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene mitocondrial codificador da subunidade I do citocromo C oxidase (*cox I*).

1.2 Específicos

- a) Analisar fezes de cães domésticos quanto à presença de ovos de tenídeos por meio da microscopia comum após o emprego de técnica de sedimentação espontânea;
- b) Reproduzir protocolo de PCR para o gene *cox I* de *Echinococcus* sp. testando previamente a reprodutibilidade e sensibilidade de detecção do amplicon esperado (450 bp) para posterior aplicação nas amostras do estudo;
- c) Realizar o sequenciamento automático dos amplicons obtidos para a confirmação das espécies detectadas na comparação com sequências de *Echinococcus* sp. depositadas no GenBank.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Considerações éticas

Esse estudo foi realizado de acordo com as avaliações éticas da Comissão de Ética no Uso de animais da Fiocruz - CEUA/Fiocruz e do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP Fiocruz/IOC, sendo aprovado de acordo com o estabelecido nas licenças de cada comitê ético, L-035/2015 e 39632014.1.0000.5248 (CAAE), respectivamente.

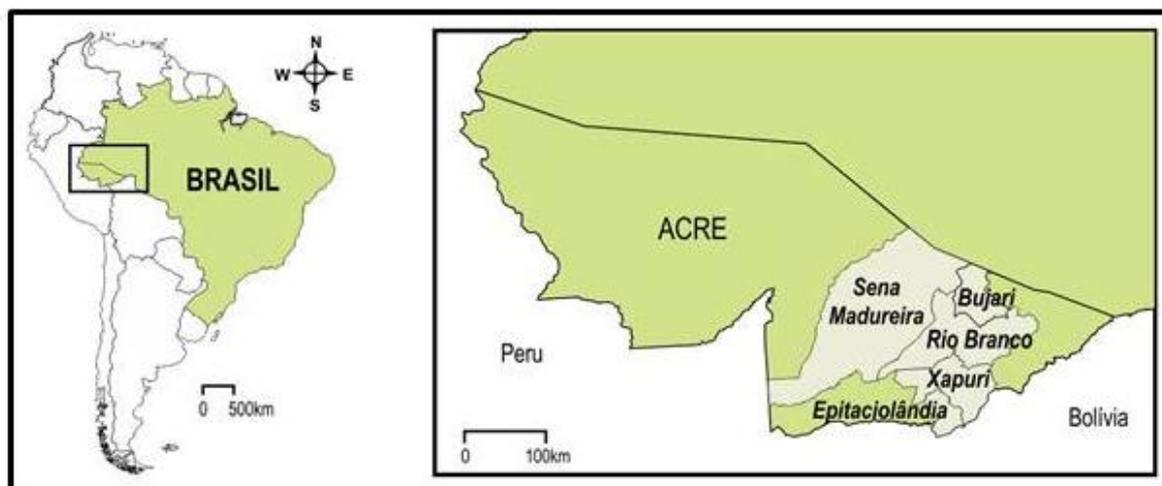
2.2 Áreas de estudo

As amostras de fezes de cães foram coletadas de locais públicos e/ou residências (ou propriedades) localizadas no estado do Acre. As expedições foram realizadas em agosto de 2014 e junho/julho de 2015. Todas as fazendas, colocações e colônias visitadas foram propriedades localizadas, respectivamente, em áreas rurais, seringais e assentamentos pertencentes aos municípios de Rio Branco ($-67^{\circ}48'30''\text{W}$ e $-6^{\circ}58'32''\text{S}$), Bujari ($-67^{\circ}57'08''\text{W}$ e $-9^{\circ}49'50''\text{S}$), Xapuri ($-68^{\circ}30'16''\text{W}$ e $-10^{\circ}39'06''\text{S}$) e Epitaciolândia ($-68^{\circ}44'29''\text{W}$ e $-11^{\circ}01'44''\text{S}$) (IBGE, 2016).

Também foram incluídas nesse estudo, 14 amostras de fezes oriundas de cães de habitantes da Floresta Estadual do Antimary (FEA) no município de Sena Madureira ($-68^{\circ}39'28''\text{W}$ e $-09^{\circ}04'02''\text{S}$) (IBGE, 2016), coletadas em 2013 e cujos sedimentos fecais encontravam-se armazenados no Serviço de Referência Nacional em Hidatidose do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados do Instituto Oswaldo Cruz Fiocruz (SRNH-LHPV-IOC/Fiocruz).

A escolha das localidades foi baseada nos relatos de casos humanos de equinococose policística registrados anteriormente nos municípios de estudo (ALMEIDA, 2012). Os municípios de coleta estão representados na Figura 6.

Figura 6 – Localização das áreas estudadas no Acre

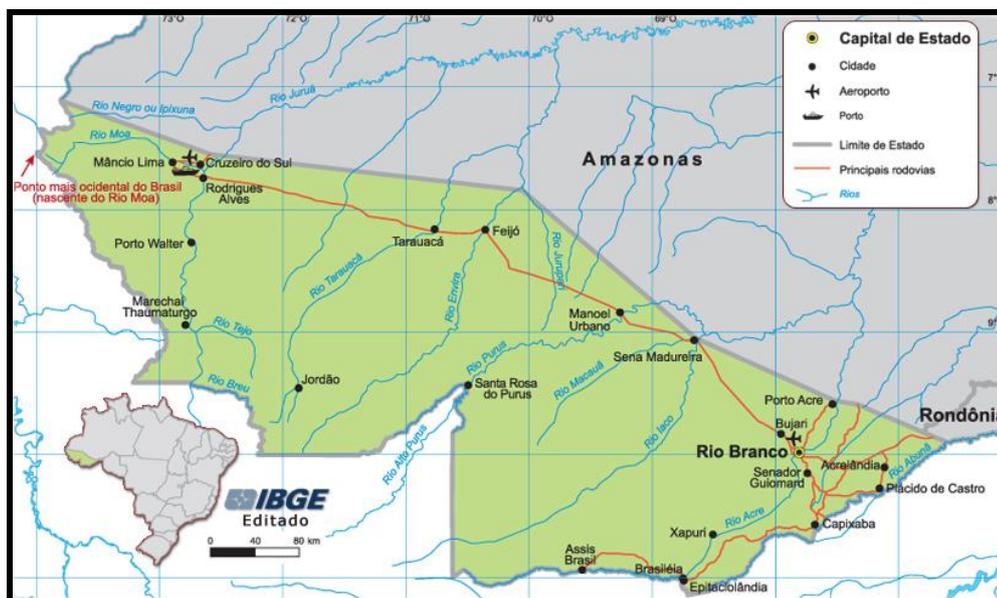


Fonte: Ilustração de Heloisa Diniz do Serviço de Produção e Tratamento de Imagem – IOC/Fiocruz-RJ.

Nas regiões de Floresta Amazônica, a divisão das localidades dentro dos estados e cidades é realizada pelas próprias associações de moradores. O que é conhecido como bairro nos outros estados do Brasil, nas áreas rurais do Acre pode ser chamado de seringal ou assentamento. O primeiro é caracterizado pela distribuição mais espaçada das famílias dentro de uma área de reserva florestal com o desenvolvimento de atividades exploratórias florestais sustentáveis. Os assentamentos são áreas que reúnem um número maior de famílias no mesmo local, com áreas menores e mais definidas para os peridomicílios, porém, com a vantagem de usufruir de recursos e serviços oferecidos pelo governo. Por sua vez, cada propriedade, seja no seringal ou assentamento, é diferenciada, respectivamente, pelo nome único de sua colocação ou colônia, sendo estas representações similares aos números das casas em um bairro, conforme acontece em outros estados brasileiros (PEREIRA, 2014).

De acordo com dados do Portal do Governo do Acre, o estado foi incorporado ao Brasil em 1903 e possui 88% de cobertura florestal. Ele é o 15º em extensão territorial, com uma superfície de 164.221,36 km², correspondente a 4,26% da Região Norte e a 1,92% do território nacional. O Estado está situado num planalto com altitude média de 200 metros, localizado no sudoeste da Região Norte, entre as latitudes de -7°06'56"N e longitude de -73°48'05"N, latitude de -11°08'41"S e longitude -68°42'59"S. Os limites do Estado são formados por fronteiras internacionais com Peru e Bolívia e por divisas estaduais com os estados do Amazonas e Rondônia. As cidades mais populosas são: Rio Branco, Cruzeiro do Sul, Feijó, Tarauacá e Sena Madureira (PORTAL DO GOVERNO DO ACRE, O ESTADO, 2015). Um mapa mais detalhado do Acre pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 – Mapa do Acre



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: < <http://www.guiageo.com/acre.htm> >.

De acordo com dados do IBGE sobre a hidrografia e economia do Acre, a maioria das cidades e povoados acreanos se originou as margens dos rios. Os principais cursos d'água da rede hidrográfica correm na direção Nordeste e são afluentes da margem direita do rio Solimões, que a partir de Manaus recebe o nome de Amazonas. Estes rios são cheios de curvas, chamadas de “meandros”. No que se refere a outros usos econômicos, foram identificadas áreas onde predominam a exploração madeireira e o extrativismo vegetal de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) e de seringueira (*Hevea guianensis*), associados entre si, às lavouras alimentares para subsistência, a caça de animais silvestres e pesca. Os seringueiros, que além de explorarem a borracha e praticarem lavouras de subsistência, a pesca e a caça, são também envolvidos com atividades pecuárias (IBGE, 2016).

A capital do Acre, Rio Branco, possui um grande número de bairros devido a um intenso processo migratório ocorrido nos anos 70. Isto fez a cidade concentrar metade da população, com cerca de 290.000 habitantes ocupando também o quinto lugar em extensão territorial no estado, 8.831 km². O município de Rio Branco limita-se ao norte com os municípios de Bujari e Porto Acre; ao sul com os municípios de Xapuri e Capixaba; a leste, com o município de Senador Guiomard e a oeste, com o município de Sena Madureira. Rio Branco possui 15 projetos de assentamentos, totalizando uma área de 81.352 hectares (PORTAL DO GOVERNO DO ACRE. O ESTADO, 2015).

O município de Bujari situa-se às margens da BR 364, rodovia de 4.324,6 km que liga o Acre a São Paulo, e sua origem está relacionada ao comércio e ao extrativismo vegetal. Bujari era uma colocação de seringa pertencente ao seringal Empreza, atual cidade de Rio Branco. A urbanização ocorreu paralelamente à construção do trecho da BR 364 entre Rio Branco e Sena Madureira. A sede municipal de Bujari fica a 21 km da capital Rio Branco. Sua área é cortada por dois rios: o Antimari e o Andirá, que são de suma importância para a vida da população que vive nas suas margens. Bujari possui hoje a décima nona população do Estado e ocupa o décimo sexto lugar em tamanho de área. A economia local baseia-se no comércio, no extrativismo vegetal, na pecuária e na agricultura de subsistência, com destaque para a piscicultura e a produção de hortaliças. Apresentando 6.543 habitantes, o município abrange uma área de 3.037 km². Bujari limita-se ao norte, com o estado do Amazonas; ao sul, com o município de Rio Branco; a leste, com o município de Porto Acre e a oeste, com o município de Sena Madureira. Em Bujari encontra-se os Projetos de Assentamento Extrativistas (PAEs) Canary e São Pedro (Limoeiro), ambos com parte de suas áreas localizadas dentro da Floresta Estadual do Antimary, considerada uma Unidade de Conservação de Uso Sustentável (PORTAL DO GOVERNO DO ACRE. BUJARI, 2015).

A Floresta Estadual do Antimary (FEA) foi criada em 1988, para promoção da conservação e do uso sustentável dos recursos florestais, como parte de uma política de uso do solo que pudesse ser utilizada como modelo para outras regiões da Amazônia. Esta área é composta pelo seringal Limoeiro e por parte dos seringais Arapixi, Pacatuba e Mapinguari. Encontra-se situada no município do Bujari, compreendendo uma faixa de terra cujo limite de um lado é o Estado do Amazonas e do outro a BR-364. A reserva abrange uma área que engloba a própria floresta (57.629 hectares) e áreas do Projeto Limoeiro (11.150 hectares). Com exceção das primeiras atividades de exploração realizadas em 2003 e 2004, a FEA não sofreu nenhuma forma de exploração madeireira, seja sobre planos de manejo ou de forma convencional. Entretanto, há muitos anos que a população local vem utilizando recursos florestais não madeireiros como forma de subsistência (AQUINO et al., 2011).

Uma parte da FEA está localizada no município de Sena Madureira, abrigando cerca de 80 famílias de seringueiros nesta região. Sena Madureira, atualmente, é o terceiro município mais populoso do Estado e o segundo em extensão territorial. Ele representa o pólo econômico da regional Alto Purus e possui uma conexão muito intensa com Rio Branco, situada a uma distância de 136 km. Apresentando 34.230 habitantes, o município abrange uma área de 23.732 km². Sena Madureira limita-se ao norte com o estado do Amazonas; ao sul, com o município de Assis Brasil; a leste, com os municípios de Bujari, Rio Branco,

Xapuri e Brasiléia; a oeste com o município de Manuel Urbano e a sudoeste, com a República do Peru. O município conta com cinco projetos de assentamento: Favo de Mel, Oriente, João Batista, Uirapuru e Joaquim de Matos, um Projeto de Assentamento Rápido Mário Lobão, um Projeto de Assentamento Dirigido Boa Esperança, um Projeto de Assentamento Extrativista Riozinho, um Projeto Estadual Pólo agroflorestal Elias Moreira, dois Projetos de Assentamento Florestal Providência Capital e Valência, e a Reserva Extrativista Cazumbá/Iracema (CENAMO, 2011).

Xapuri localiza-se ao sul do estado do Acre a 106 km da capital Rio Branco. Fundada oficialmente em março de 1904 teve seu surgimento diretamente relacionado à expansão do extrativismo da borracha no final do século XIX, que resultou na fundação dos seringais amazônicos. O município ocupa o nono lugar em população no Estado e a décima segunda posição em área. É o município mais visitado do estado por conta, principalmente, dos monumentos históricos da época da Revolução Acreana e da casa onde residia Chico Mendes. Xapuri limita-se ao norte com Rio Branco; ao sul, com o município de Eptaciolândia; a leste, com o município de Capixaba; a oeste, com o município de Sena Madureira e a sudoeste, com o município de Brasiléia. Apresentando 14.314 habitantes, o município abrange uma área de 5.347 km². Em Xapuri encontra-se o Projeto de Assentamento Tupá, os PAE (Projeto de Assentamento Extrativista) Chico Mendes e Equador e os Projetos Estaduais em forma de Pólos Agroflorestais: Xapuri I e II (PORTAL DO GOVERNO DO ACRE. XAPURI, 2015).

O município de Eptaciolândia possui sua sede municipal situada na margem direita do rio Acre localizando-se a 155 km da capital Rio Branco. Eptaciolândia possui uma forte ligação econômica com a cidade vizinha de Cobija (Bolívia) pela ponte do igarapé Bahia e mantém um grande intercâmbio comercial com a vizinha Brasiléia, por meio de uma ponte sobre o rio Acre. Eptaciolândia ocupa o décimo segundo lugar em número de população (13.434 habitantes) e o vigésimo segundo lugar em tamanho de área (1.655 km²), sendo o menor município do Estado do Acre. As principais atividades econômicas desenvolvidas no município são o comércio em pequena escala; a indústria madeireira e moveleira; a agricultura de subsistência; e uma crescente atividade pecuarista. Eptaciolândia limita-se ao norte, com o município de Xapuri; ao sul e a leste, com a Bolívia e a oeste, com o município de Brasiléia. O município possui dois projetos de assentamentos, o Pólo Agroflorestal de Eptaciolândia e o PAE Porto Rico, com este último, criado em 1991, assentando em torno de 47 famílias em uma área de 7.530 hectares (SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE DO ACRE, 2012).

2.3 Obtenção das amostras de fezes de cães

As amostras de fezes utilizadas no presente trabalho foram provenientes de residências ou propriedades das áreas de estudo cujo(s) proprietário(s) possuía(m) pelo menos um cão. A participação na pesquisa foi oficializada mediante a assinatura voluntária do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A) e disponibilidade para entrevista, cujas perguntas e respostas foram, respectivamente, orientadas e registradas na utilização de um questionário padrão (ANEXO B). Dentre todas as informações do questionário, as observações mais relevantes registradas foram o número de cães e de indivíduos residentes em cada local e o relato da prática de alimentação do(s) cão(es) com carne de caça, sobretudo com vísceras cruas de paca. Também foram considerados e tratados com a mesma importância, aquele(s) cão(es) que não recebiam às vísceras diretamente pelos proprietários mas que acabavam se alimentando do material descartado de forma inadequada.

Cada residência ou propriedade foi considerada um ponto de coleta específico independente da quantidade de cães que lá residiam. Amostras de fezes, por ventura, encontradas em locais públicos como estradas (ou ramais) também foram coletadas e dispensaram a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido.

Quando possível, os pontos de coleta tiveram o registro fotográfico e as coordenadas geográficas obtidas com o auxílio de máquina fotográfica (FujiFilm – modelo FinePix XP30 - Japão) integrada com sistema de posicionamento global (GPS). Informações adicionais sobre os locais e os momentos de cada coleta foram registradas nos respectivos questionários aplicados e destinados a cada ponto. Imagens de alguns pontos de coleta e as características de alguns cães das áreas de estudo estão representadas nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Após a explicação da importância do projeto no momento da visita, foi realizada uma busca ativa no peridomicílio para a procura de fezes de cão(es) no ambiente, dando prioridade para os locais de maior circulação, permanência e preferência para a prática da defecação, com base nos comportamentos do(s) cão(es) observados pelo(s) proprietário(s) em cada ponto de coleta. A impossibilidade de permanência nos locais de coleta pelo tempo necessário à espera da defecação, fez com que fossem coletadas amostras de fezes eliminadas pelo(s) cão(es) fora dos momentos de visita em praticamente quase todos os pontos, mas com priorização de amostras ainda úmidas e/ou pouco ressecadas. Amostras de fezes muito ressecadas e duvidosas quanto à procedência biológica, não foram coletadas. A busca pelas amostras foi facilitada nos locais em que o(s) proprietário(s) mantinha(m) o(s) cão(es)

contido(s) por certo período de tempo em um determinado local do peridomicílio. A obtenção de amostras recém-eliminadas foi facilitada em alguns locais, pelo próprio costume dos cães defecarem tão logo saírem da área da propriedade. O comportamento de caminhar rumo às áreas de florestas acompanhado de seu(s) cão(es) facilitou a coleta em alguns pontos, pois os proprietários promoveram tal atividade no momento da visitação. A ausência do(s) cão(es) no momento da visitação não impediu a coleta de amostra(s), em algumas localidades.

Cada amostra de fezes de cães localizada no ambiente passou por um registro fotográfico e foi dividida, com auxílio de luvas e palitos de madeira, em duas partes de tamanho aproximado, sendo transferidas para tubos de 50 mL (Figura 10). Um dos tubos recebeu formalina a 10% e o outro, etanol a 70%, ambos mantendo a proporção de uma parte de fezes e três do conservante. Cada tubo foi identificado de acordo com o mesmo número do ponto de coleta registrado no questionário e transportado de forma bem vedada para o laboratório. O município, o quantitativo, o ano e o ambiente de coleta das amostras oriundas do Acre estão descritas na Tabela 1.

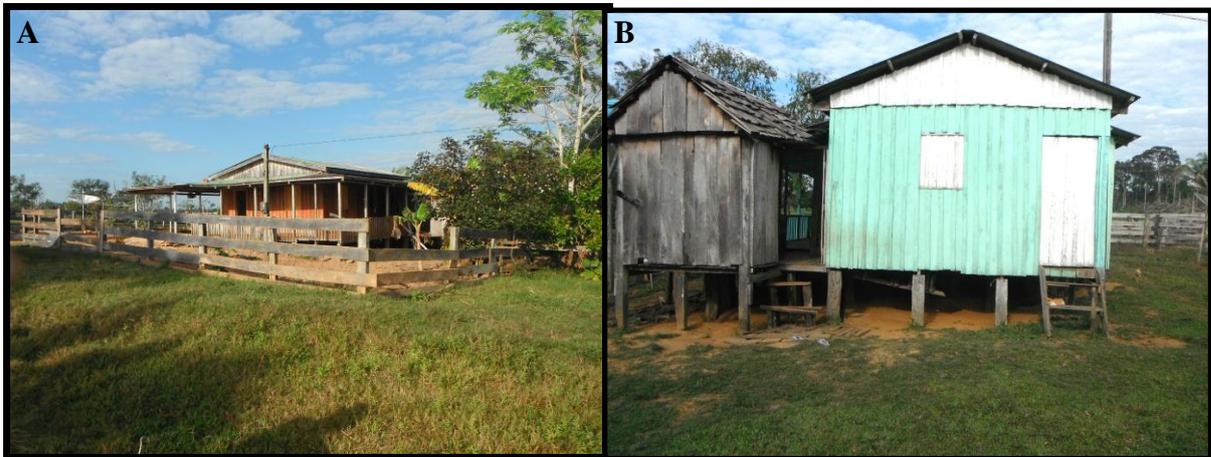
Tabela 1 – Localidade, quantitativo, ambiente e ano de coleta das amostras de fezes do Acre

Município	Número de amostras (n=75)	Ambient e peridomiciliar (n=69)	Estradas* (n=06)	Ano de coleta
Sena Madureira	14	14	----	2013
Rio Branco	6	6	----	2014
Bujari	7	6	1	2014
Xapuri	36	33	3	2014 e 2015
Epitaciolândia	12	10	2	2015

Nota: * em todos os pontos foi visualizado pelo menos um cão errante circulando próximo da amostra.

As amostras de fezes utilizadas como controles negativos na reação em cadeia da polimerase (PCR) foram àquelas recém-eliminadas provenientes de cães de residência do Rio de Janeiro (área não endêmica de equinococose), localizada no bairro de Anchieta (S22°82'63" e W43°39'05"), zona norte da capital. Uma pessoa vivia no local na companhia de 11 cães (dois machos e nove fêmeas). Foram coletadas cinco amostras em setembro de 2014 e os critérios para a utilização dessas amostras como controles estavam presentes: exame parasitológico de fezes negativo para ovos de helmintos; alimentação exclusiva com ração; circulação restrita ao interior da residência; e proprietário consentindo com a coleta mediante a assinatura voluntária de termo de consentimento livre e esclarecido. Essas amostras foram coletadas e conservadas da mesma maneira daquelas obtidas nas áreas de estudo.

Figura 8 - Imagens representativas dos pontos de coleta das áreas de estudo



Legenda: (A) propriedade de assentamento (colônia) em Xapuri; (B) propriedade de seringal (colocação) em Xapuri.

Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose – IOC/Fiocruz – RJ.

Figura 9 - Imagens representativas das características dos cães das áreas de estudo



Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose – IOC/Fiocruz – RJ.

Figura 10 - Imagens das fezes de cães no ambiente e da coleta de amostras



Fonte: Serviço de Referência Nacional em Hidatidose – IOC/Fiocruz – RJ.

2.4 Exame parasitológico de fezes

Visando a procura de ovos de tenídeos, cada amostra de fezes mantida em formalina a 10% foi submetida ao método de Lutz (LUTZ, 1919). Após a sedimentação em cálices apropriados, por no mínimo 12 horas, o material foi analisado entre lâmina e lamínula, em microscópio de campo claro (Nikon – modelo Eclipse E200 - China), com aumentos de até 400 vezes. A inspeção da lâmina foi realizada a partir da escolha de um canto, promovendo-se uma análise até o canto oposto, em movimentos de ida e volta, procurando sempre sobrepor parcialmente os campos microscópicos por toda a extensão da lâmina delimitada pela lamínula. A análise do sedimento contou com a participação de pelo menos dois profissionais capacitados. Foram realizados registros fotográficos dos ovos encontrados com câmera digital (Nikon – modelo DS-Fi1 - China) acoplada ao microscópio e as imagens foram editadas em

um analisador digital de imagens equipado com o programa Nis-Elements AR (Nikon – EUA). Além de ovos de tenídeos, ovos de outros helmintos também foram considerados e registrados da mesma maneira.

As amostras de Sena Madureira obtidas em 2013 cujos sedimentos já estavam mantidos em tubos com etanol a 70% no SRNH-LHPV-IOC/Fiocruz também foram analisadas de forma similar às amostras coletadas em 2014 e 2015, mesmo não tendo sido conservadas em formalina a 10%.

2.5 Análise morfométrica

Todos os ovos esféricos ou subglobulares contendo embrióforo radialmente estriado e ganchos no embrião (característicos de tenídeos) encontrados no sedimento fecal foram medidos com relação ao tamanho dos seus comprimento e largura totais com a utilização do analisador digital de imagens equipado com o programa Nis-Elements AR (Nikon – EUA). O mesmo ocorreu para os outros os ovos de helmintos encontrados, sobretudo para os de tricurídeos, uma vez que as medições obtidas contribuiriam para a distinção entre os ovos de *Trichuris* sp. e *Calodium hepaticum*.

2.6 Extração e quantificação de DNA total das fezes

As amostras de fezes mantidas em etanol a 70% foram submetidas a uma sedimentação espontânea. Após a sedimentação em cálices apropriados, por no mínimo 12 horas, os sedimentos resultantes foram armazenados a -20°C até serem utilizados no protocolo de extração. O kit empregado para extração foi o QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Sample & Assay Technologies - Alemanha), com a implementação de duas etapas adicionais prévias àquelas descritas pelo fabricante (utilização de pérolas de vidro e mistura de polivinipirrolidona na amostra) e uma modificação no próprio protocolo do kit cujo tempo de incubação das amostras a 95°C no tampão de lise ASL foi realizado por 60 minutos e não por 5 minutos conforme o recomendado.

Para extração de DNA total foram misturados em tubos com capacidade de 1,5 mL, 200 µL de sedimento fecal, 0,2 gramas de pérolas de vidro de 425 a 600 µm de diâmetro (SIGMA - Brasil), 1,0 mL do tampão ASL do kit e 120 µL de polivinilpirrolidona a 10% (PVP – SIGMA - Brasil). Somente após agitação dos tubos em agitador (Scientific Industries – modelo Vortex Genie 2 - EUA) por três minutos, na rotação máxima, com intervalos de três minutos entre cada agitação, que as etapas do protocolo estabelecido pelo fabricante do kit foram executadas. A partir de então os tubos foram levados ao termobloco (Labnet – modelo Accublock - EUA) e aquecidos a 95°C por 60 minutos. Para separar as pérolas de vidro do sobrenadante, os tubos foram levados à centrífuga (Eppendorf – modelo Centrifuge 5415 C - Alemanha) promovendo-se uma leve centrifugação (*spin*) durante 30 segundos. O material oriundo da lise foi transferido para tubo com capacidade de 2,0 mL, sendo centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dissolver a pastilha inhibitex (própria do kit) em outro tubo de 2,0 mL e a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm durante 3 minutos. O novo sobrenadante foi então transferido para tubo de 1,5 mL e uma centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos foi realizada. Todo sobrenadante resultante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL, porém apenas 200 µL desse conteúdo foram misturados a 15 µL de proteinase K e a 200 µL do tampão AL do kit. Após incubação a 70°C em termobloco por 10 minutos, o conteúdo foi misturado a 350 µL de etanol absoluto e agitado em vórtex, na máxima velocidade, sendo transferido logo em seguida para o interior da coluna QIAamp Spin Collum já acoplada em tubo coletor de 2,0 mL, fornecidos pelo kit. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto e a mesma coluna foi acoplada em outro tubo coletor de 2,0 mL, desprezando-se o conteúdo filtrado. No interior da coluna foram adicionados 500 µL do tampão AW1 do kit e o conteúdo foi novamente centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto, procedendo da mesma maneira com 500 µL do tampão AW2 do kit, com a utilização da mesma coluna e descartando também o conteúdo filtrado. O DNA total extraído foi recolhido em um tubo de 1,5 mL após a adição de 100 µL do tampão AE do kit e centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto.

Um total de 2,0 µL de cada conteúdo resultante da extração foi submetido a quantificação de DNA total em espectrofotômetro (Uniscience - modelo NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 - EUA) e o restante do extrato foi mantido a -20°C até ser utilizado no protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR). A concentração de DNA total de cada amostra foi expressa pelo equipamento em ng/µL.

2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O preparo das reações de PCR foi realizado em tubos de 0,2 mL manipulados em estação de trabalho de uso específico para esta finalidade (Câmara asséptica – Permution - Brasil). O interior da estação foi irradiado previamente com luz ultravioleta por, no mínimo, 15 minutos. Os DNAs controles, bem como todos os conteúdos de DNA total extraídos a serem analisados, foram aplicados nos tubos de reação em ambiente limpo e previamente irradiado com luz ultravioleta, fornecido por fluxo laminar de cabine de segurança biológica (Telstar – modelo Bio II A/P - Espanha). A manipulação dos DNAs a serem aplicados nos tubos de reação foi realizada em sala diferente do local onde as reações foram preparadas.

2.7.1 Controles da PCR

Durante todas as reações de PCR foram incluídos controles positivo e negativo. O DNA utilizado como controle positivo em todas as PCRs realizadas foi proveniente de extração de protoescolíces (mestacestóide) de *E. granulosus* s.s. (G1), isolado de pulmão de bovino. O único teste no qual se incluiu também mais um controle positivo diferente foi a PCR realizada para avaliação prévia da reprodutibilidade do protocolo adotado. Nesta, foi utilizado também DNA proveniente de extração de protoescolíces de *E. ortleppi* (genótipo 5), isolado de pulmão de bovino. Ambos DNAs (controles positivos) foram cedidos já extraídos pelo professor e pesquisador Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira do Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os controles negativos utilizados nas PCRs incluíram reações isentas de aplicação de DNA e a utilização dos extratos de DNA total provenientes de cinco amostras fecais de cães residentes fora da área de estudo (Rio de Janeiro).

2.7.2 Testes prévios para a avaliação da reprodutibilidade e sensibilidade do protocolo de PCR

O teste de reprodutibilidade foi realizado com a utilização de 0,5 µL de *E. ortleppi* (genótipo 5) na concentração de 8,520 ng/µL e 0,5 µL de DNA de *E. granulosus* s.s. (genótipo 1) na concentração de 30,700 ng/µL. Os DNAs foram quantificados previamente em espectrofotômetro (Uniscience - modelo NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 - EUA). O teste foi realizado com reações de 50,0 µL de volume total e também incluiu um controle negativo isento de qualquer fonte de DNA. A concentração final de DNA utilizada na PCR para cada controle positivo foi de 0,085 ng/µL para *E. ortleppi* e 0,307 ng/µL para *E. granulosus* s.s. (G1)

O teste de sensibilidade foi realizado com a utilização de 1,0 µL de DNA controle de *E. granulosus* s.s. (genótipo 1 - concentração de 330,200 ng/µL) e 1,0 µL de cada DNA proveniente de concentrações diferentes obtidas por meio de diluições realizadas com o DNA controle em água ultrapura. A partir do tubo contendo DNA controle na concentração de 330,200 ng/µL foram realizadas oito diluições seriadas, praticando-se diluições de dez vezes com relação à anterior, obtendo-se concentrações que variaram desde 33,0 ng/µL até 0,000003 ng/µL. A sensibilidade para detecção do DNA controle foi testada em reações de 50,0 µL que além de incluir um controle negativo isento de qualquer fonte de DNA, contou com uma PCR capaz de avaliar diferentes concentrações de DNA que foram testadas dentro da faixa entre 0,00000006 ng/µL e 6,600 ng/µL de concentração final.

2.7.3 PCR com as amostras do estudo

Todos os conteúdos totais extraídos de cada sedimento fecal foram submetidos ao protocolo de PCR desenvolvido inicialmente por Bowles et al., 1992 e aprimorado (SANCHEZ et al., 2010; SANTOS et al., 2012). Os extratos foram testados quanto a apresentação de sinais de amplificação de fragmento de 475 bp (amplicon) do gene codificador para a subunidade 1 da citocromo C oxidase (*cox 1*). Os iniciadores (ou primers) utilizados foram os desenhados inicialmente para regiões conservadas de *cox 1* publicadas para *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, sendo eles, o iniciador direto

5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3', denominado de CO1f e o reverso, 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3', denominado de CO1r. As condições adotadas utilizadas na PCR para estes iniciadores incluíram as modificações realizadas com relação à concentração de reagentes (SANCHEZ et al., 2010) (Tabela 2) e àquelas estabelecidas por Santos et al. (2012) com relação às condições térmicas (Quadro 1).

Tabela 2 - Reagentes, concentrações e volumes utilizados na PCR para o gene *cox I*

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

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

Quadro 1 - Condições térmicas utilizadas na PCR para o gene *cox I*

			Total de ciclos
Etapa 1	<i>Hot Start</i>	Desnaturação a 94°C por 4 minutos	1
Etapa 2	Ciclo 1		2
	Desnaturação 94°C / 45''	Hibridização 55°C / 45''	
Etapa 3	Ciclo 2		2
	Desnaturação 94°C / 45''	Hibridização 54°C / 45''	
Etapa 4	Ciclo 3		2
	Desnaturação 94°C / 45''	Hibridização 53°C / 45''	
Etapa 5	Ciclo 4		2
	Desnaturação 94°C / 45''	Hibridização 52°C / 45''	
Etapa 6	Ciclo 5		2
	Desnaturação 94°C / 45''	Hibridização 51°C / 45''	

Quadro 1 – continuação.

Etapa 7	Ciclo 6			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45''	50°C / 45''	72°C / 45''	
Etapa 8	Ciclo 7			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45''	49°C / 45''	72°C / 45''	
Etapa 9	Ciclo 8			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45''	48°C / 45''	72°C / 45''	
Etapa 10	Ciclo 9			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45''	47°C / 45''	72°C / 45''	
Etapa 11	Ciclo 10			2
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45''	46°C / 45''	72°C / 45''	
Etapa 12	Ciclo 10			20
	Desnaturação	Hibridização	Extensão	
	94°C / 45''	45°C / 45''	72°C / 45''	
Etapa 13	Extensão final	Alongamento a 72°C por 7 minutos		1

Os DNAs totais provenientes das amostras de estudo foram testados em dois testes de PCR com a utilização de volumes diferentes de conteúdo extraído nas reações. Primeiramente o volume de 3,0 µL foi definido tomando-se por base a quantificação prévia dos DNAs totais extraídos para que todos fossem utilizados dentro da faixa de concentração verificada no teste de sensibilidade de detecção do DNA controle. Uma segunda PCR foi realizada com 6,0 µL dos conteúdos extraídos, independentemente da concentração de DNA total observada na quantificação. As concentrações finais de DNA total utilizadas nas duas PCRs variaram entre 0,128 e 6,100 ng/µL para a PCR utilizando 3,0 µL e entre 0,253 e 12,200 ng/µL para a PCR com 6,0 µL.

2.7.4 Spiking com as amostras negativas e PCR de contraprova

Todas as amostras do estudo supostamente negativas nos dois testes de PCR realizados, só foram consideradas isentas da presença de DNA de *Echinococcus* sp. (considerando o protocolo adotado) após verificação da possibilidade de inibição das reações.

Foi realizado *spiking* (contaminação proposital da amostra com DNA conhecido) com o DNA controle de *E. granulosus* (genótipo 1) em uma parte de cada conteúdo extraído das amostras primariamente negativas e, em seguida, uma nova PCR para a busca de sinais de amplificação.

O *spiking* foi promovido em tubos de 1,5 mL com a junção de 2,0 µL de DNA controle (concentração de 3,070 ng/µL) e 10,0 µL de cada conteúdo fecal extraído das amostras em questão, obtendo-se a concentração final de 0,511 ng/µL de DNA controle em cada extrato.

A PCR foi realizada com reações de 50,0 µL de volume total utilizando 1,0 µL de DNA do conteúdo de cada *spiking*, empregando a concentração final de 0,010 ng/µL de DNA controle para cada reação. Esta concentração de DNA controle estava de acordo com testado previamente no teste de sensibilidade da PCR.

As amostras que apresentaram o amplicon esperado (450 bp) na PCR realizada após o *spiking* foram consideradas originalmente negativas quanto a presença de DNA de *Echinococcus* sp., pois os seus conteúdos foram incapazes de inibir a última PCR e puderam ser analisados como contraprova das primeiras PCRs com relação a presença de inibidores não removidos no protocolo de extração. As amostras que permaneceram negativas foram consideradas indeterminadas.

2.7.5 Eletroforese e visualização dos sinais de amplificação das PCRs

O procedimento adotado para a eletroforese de todos os testes de PCR foi o descrito por Sambrook & Russel (2001). Um volume de 10,0 µL de cada amostra foi misturado com 2,0 µL de tampão carreador (Blue/Orange Loading Dye – Promega - Brasil) e 5,0 µL de corante GelRed (Biotium - Brasil) previamente diluído 500 vezes em água ultrapura. A

mesma proporção entre amostra, tampão carreador e GelRed foi utilizada para o marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega - Brasil). O conteúdo foi aplicado em gel de agarose (Promega - Brasil) a 1,0%. A eletroforese das amostras no gel foi realizada por aproximadamente 60 minutos em tampão TBE (Tris-borato-EDTA) 1X (Promega - Brasil) no interior de cuba apropriada (Hoefer – modelo SUB 15 - EUA). A condição de 90 volts foi mantida por fonte de eletroforese (BioRad – modelo Power PAC 1000) durante o procedimento. Após a eletroforese, os sinais de amplificação bem como o marcador de peso molecular foram observados no gel e fotografados por meio de sistema de foto-documentação (BioRad – modelo Gel Doc 2000 - EUA) associado ao programa Quantity One – Versão 4.6.9 Basic (BioRad - EUA).

2.8 Sequenciamento automático e análise dos DNAs detectados

Para o sequenciamento automático dos amplicons resultantes da PCR, os produtos das reações foram purificados utilizando o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare – Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. Ambas as fitas de DNA foram sequenciadas utilizando os iniciadores PCO1f e PCO1r e o kit comercial ABI Prism™ BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems - EUA). A análise das sequências foi realizada no sequenciador automático Analisador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems - EUA), da subunidade RPT01A de Sequenciamento Automático – IOC/RJ da Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz. As duas sequências nucleotídicas obtidas (senso e antisenso) foram analisadas, alinhadas e editadas com o auxílio da versão 4.9 do programa Sequencher™ (Gene Codes Corporation - EUA) e, posteriormente, comparadas com as sequências de *Echinococcus* sp. depositadas no GenBank - National Center for Biotechnology Information dos Estados Unidos (NCBI-EUA), com o auxílio da ferramenta BLAST do próprio NCBI-EUA. O acesso aos programas e as instruções de utilização foram promovidos pela colaboração da Dra Luciana Trilles do Laboratório de Micologia Ambiental do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/Fiocruz-RJ.

3 RESULTADOS

3.1 Amostras obtidas

O número de amostras de fezes de cães analisadas no estudo foi 80, sendo 75 oriundas do Acre e 05 do Rio de Janeiro. As amostras do Acre foram coletadas em 44 pontos de coleta distribuídos pelas áreas de estudo. Com exceção de 06 amostras coletadas em estradas (01 de Bujari, 03 de Xapuri e 02 de Epitaciolândia), todas as demais do Acre (n=69) foram coletadas no ambiente peridomiciliar das residências ou propriedades visitadas.

Não houve relato da administração de anti-helmíntico nos cães de todos os pontos de coleta visitados no Acre e a falta de informações fidedignas quanto ao sexo e a idade dos cães na maior parte dos pontos visitados impossibilitou o registro adequado desses dados.

As Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7 demonstram informações sobre os pontos de coleta em cada município. As tabelas descrevem o número de amostras coletadas, o número de cães e de indivíduos residentes nos locais, o tipo de área onde a propriedade estava inserida (entre fazenda, assentamento ou seringal) e se havia relato da oferta de vísceras de animais de caça (incluindo pacas) para a alimentação dos cães.

A Figura 11 demonstra os municípios de estudo no Acre apontando a localização geográfica de 36 dos 44 pontos de coleta de amostras de fezes. Não foi possível a obtenção das coordenadas geográficas de 08 pontos de coleta no momento da visita (06 pontos de Xapuri e 02 de Epitaciolândia). A figura demonstra também o número de amostras obtidas em cada ponto, além de informações referentes ao mapeamento dos locais onde existe a prática da alimentação do(s) cão(es) com carne de caça, incluindo vísceras de pacas.

Tabela 3 – Informações sobre os pontos de coleta em Sena Madureira - AC

Município	Ponto (P)	Amostras coletadas (n=14)	Nº de cães (n=31)	Nº de pessoas (n=27)	Tipo de área	Alimentação dos cães com vísceras*
Sena	P1	2	3	4	assentamento	sim
Madureira	P2	7	12	5	assentamento	sim
	P3	5	16	18	assentamento	sim

Legenda: * vísceras cruas de animais de caça, incluindo pacas.

Tabela 4 – Informações sobre os pontos de coleta em Rio Branco - AC

Município	Ponto (P)	Amostras coletadas (n=06)	Nº de cães (n=09)	Nº de pessoas	Tipo de área	Alimentação dos cães com vísceras*
Rio Branco	P4	2	4	5***	fazenda	não**
	P5	4	5	12	assentamento	sim

Legenda: * vísceras cruas de animais de caça, incluindo pacas; ** a alimentação não incluía carne de caça, porém, pelo menos dois cães possuíam acesso às carcaças de animais de produção mortos ou abatidos (bovinos e ovinos); *** pelo menos 5 pessoas residiam na propriedade, com exceção dos funcionários.

Tabela 5 – Informações sobre os pontos de coleta em Bujari - AC

Município	Ponto (P)	Amostras coletadas (n=07)	Nº de cães (n=17)	Nº de pessoas (n=19)	Tipo de área	Alimentação dos cães com vísceras*
Bujari	P12	1	2	4	seringal	sim
	P13	2	8	5	seringal	sim
	P14	2	5	8	seringal	sim
	P15	1	1	-----	estrada	-----
	P16	1	1	2	seringal	sim

Legenda: * vísceras cruas de animais de caça, incluindo pacas.

Tabela 6 – Informações sobre os pontos de coleta em Epitaciolândia - AC

Município	Ponto (P)	Amostras coletadas (n=12)	Nº de cães (n=19)	Nº de pessoas (n=22)	Tipo de área da propriedade	Alimentação dos cães com vísceras*
Epitaciolândia	P25	3	3	3	assentamento	sim
	P26	2	3	5	assentamento	sim
	P27	2	4	6	assentamento	sim
	P28	1	1	-----	estrada	-----
	P29	1	1	-----	estrada	-----
	P34	2	6	5	seringal	sim
	P35	1	1	3	seringal	sim

Legenda: * vísceras cruas de animais de caça, incluindo pacas.

Tabela 7 – Informações sobre os pontos de coleta em Xapuri - AC

Município	Ponto (P)	Amostras coletadas	Nº de cães	Nº de pessoas	Tipo de	Alimentação dos cães com
-----------	-----------	--------------------	------------	---------------	---------	--------------------------

	(n=36)	(n=69)	(n=97)	área	vísceras*
P6	1	1	-----	estrada	-----
P7	1	1	-----	estrada	-----
P8	1	3	-----	estrada	-----
P9	2	4	10	assentamento	não
P10	2	3	2	fazenda	sim
P11	3	2	3	assentamento	sim
P17	2	4	2	assentamento	sim
P18	1	2	3	seringal	não
P19	1	1	3	seringal	sim
P20	2	3	2	assentamento	sim
P21	1	1	6	seringal	não
P22	1	2	4	seringal	sim
P23	2	2	5	fazenda	sim
Xapuri P24	2	3	3	assentamento	não
P30	1	1	3	seringal	sim
P31	1	1	6	seringal	sim
P32	1	3	3	seringal	sim
P33	1	3	7	seringal	sim
P36	1	1	2	assentamento	sim
P37	1	3	2	seringal	sim
P38	1	3	5	seringal	sim
P39	1	7	6	seringal	sim
P40	2	3	5	seringal	sim
P41	1	3	3	assentamento	sim
P42	1	1	4	assentamento	sim
P43	1	7	4	assentamento	sim
P44	1	1	4	assentamento	sim

Legenda: * vísceras cruas de animais de caça, incluindo pacas.

Figura 11 – Municípios do Acre com os pontos de coleta do estudo



Legenda: P= ponto de coleta; n° entre parênteses= quantidade de amostras coletadas no ponto; ■ pontos de coleta onde o(s) cão(es) não são alimentados com carne de caça (n=4); ◆ pontos de coleta sem informação sobre a alimentação do(s) cão(es) (n=6); ● pontos de coleta com relato de cão(es) sendo alimentado(s) com carne de caça incluindo vísceras de pacas (n=24); ★ pontos de coleta onde foram detectadas amostras de fezes de cães com DNA de *Echinococcus* sp. (n=2; P1 – *E. vogeli*; P4 – *E. granulosus* s.s./genótipo 1).

Fonte: Ilustração de Heloisa Diniz do Serviço de Produção e Tratamento de Imagem – IOC/Fiocruz-RJ.

3.2 Exame parasitológico de fezes

Foram encontrados ovos de helmintos em 31 (41,33%) das 75 amostras oriundas do Acre (Tabela 8). Ovos de cestódeos foram encontrados em 02 amostras, sendo de *Vampirolepis nana* (= *Rodentolepis nana*, *Hymenolepis nana*) em uma (1,33%) e de tenídeo, em outra (1,33%). Também foram visualizados ovos de ancilostomídeos em 20 amostras (26,67%), *Toxocara* sp. em 09 (12,0%), *Trichuris* sp. em 06 (8,0%) e *S. lupi* em 01 (1,33%). Dentre as 31 amostras positivas, em 05 (16,13%) foram detectadas poliparasitismo, com a presença de dois e três ovos de diferentes táxons de helmintos em 03 (9,68%) e 02 (6,45%) amostras, respectivamente. De um total de 44 pontos de coleta, as amostras positivas (n=31) compreenderam 23 pontos (52,27%).

Tabela 8 – Resultado do exame parasitológico de fezes de cães por município de estudo do Acre

Município	Total de amostras			Amostras positivas	
	analisadas (n=75)	negativas (n=44 / 58,67%)	positivas (n=31 / 41,33%)	monoparasitadas (n=26 / 83,87%)	poliparasitadas (n=5 / 16,13%)
Sena Madureira	14	8 (57,14%)	6 (42,86%)	6 (100,00%)	----
Rio Branco	6	2 (33,33%)	4 (66,67%)	1 (25,00%)	3 (75,00%)
Bujari	7	2 (28,57%)	5 (71,43%)	5 (100,00%)	----
Xapuri	36	23 (63,89%)	13 (36,11%)	12 (92,30%)	1 (7,70%)
Epitaciolândia	12	9 (75,00%)	3 (25,00%)	2 (66,67%)	1 (33,33%)

As tabelas 9, 10, 11, 12 e 13 descrevem, por município, os ovos de helmintos encontrados nas amostras em cada ponto de coleta. Não foram encontrados ovos de helmintos nas amostras (n=05) oriundas do Rio de Janeiro.

Tabela 9 – Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Sena Madureira

Município	Ponto de coleta (P)	Identificação das amostras (n=6)	Ovos encontrados
Sena Madureira	P1	35-SM-A	Ancilostomídeo
		75-SM-A	Ancilostomídeo
	P2	76-SM-A	Ancilostomídeo
		77-SM-A	Ancilostomídeo
	P3		Ancilostomídeo

	134-SM-A	
	135-SM-A	<i>Toxocara</i> sp.

Legenda: SM= Sena Madureira; A= amostra A.

Tabela 10 – Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Rio Branco

Município	Ponto de coleta (P)	Identificação das amostras (n=4)	Ovos encontrados
Rio Branco	P4	01-RB-B	Ancilostomídeo / <i>Trichuris</i> sp. / Tenídeo
	P5	02-RB-A	Ancilostomídeo / <i>Trichuris</i> sp. / <i>Spirocerca lupi</i>
		03-RB-A	Ancilostomídeo / <i>Trichuris</i> sp.
		03-RB-B	Ancilostomídeo

Legenda: RB= Rio Branco; A= amostra A; B= amostra B.

Tabela 11 – Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Bujari

Município	Ponto de coleta (P)	Identificação das amostras (n=5)	Ovos encontrados
Bujari	P12	10-B-A	Ancilostomídeo
	P13	11-B-A	Ancilostomídeo
	P14	12-B-B'	Ancilostomídeo
	P15	13-B-A	Ancilostomídeo
	P16	14-B-A	Ancilostomídeo

Legenda: B= Bujari; A= amostra A; B'= amostra B.

Tabela 12 – Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Xapuri

Município	Ponto de coleta (P)	Identificação das amostras (n=13)	Ovos encontrados
-----------	---------------------	-----------------------------------	------------------

	P6	04-X-A	Ancilostomídeo
	P7	05-X-A	Ancilostomídeo
	P8	06-X-A	<i>Trichuris</i> sp.
	P10	08-X-A	Ancilostomídeo
		09-X-A	<i>Toxocara</i> sp.
	P11	09-X-B	<i>Toxocara</i> sp.
Xapuri		09-X-C	<i>Toxocara</i> sp.
	P20	18-X-A	<i>Toxocara</i> sp. / <i>R. nana</i>
		21-X-A	<i>Toxocara</i> sp.
	P23	21-X-B	<i>Toxocara</i> sp.
	P30	28-X-A	<i>Toxocara</i> sp.
	P31	29-X-A	<i>Trichuris</i> sp.
	P39	37-X-A	<i>Toxocara</i> sp.

Legenda: X= Xapuri; A= amostra A; B= amostra B; C=amostra C.

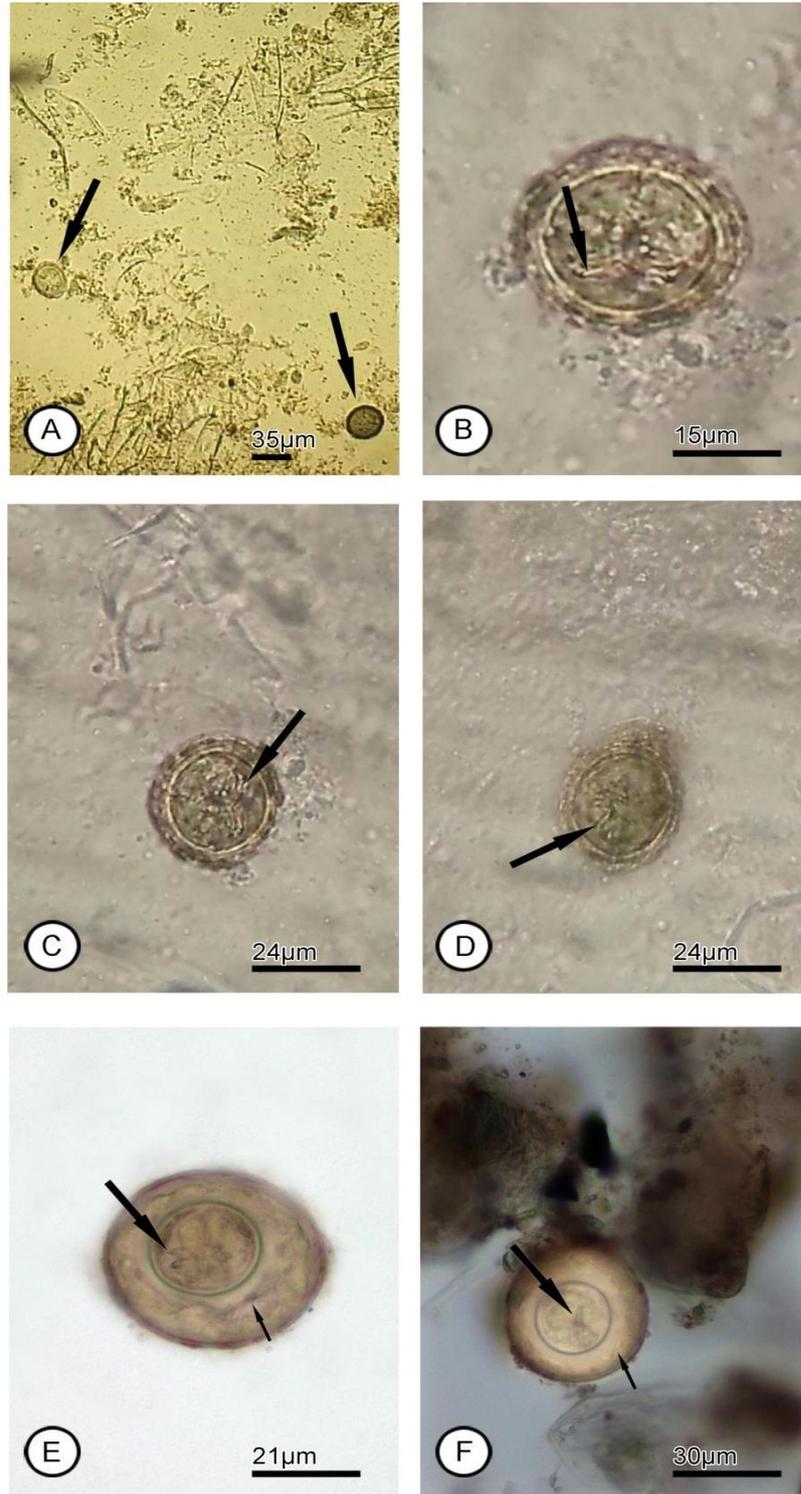
Tabela 13 – Pontos de coleta e ovos de helmintos encontrados nas amostras de Epitaciolândia

Município	Ponto de coleta (P)	Identificação das amostras (n=3)	Ovos encontrados
	P25	23-E-B	Ancilostomídeo / <i>Trichuris</i> sp.
Epitaciolândia	P26	24-E-A	Ancilostomídeo
	P35	33-E-A	Ancilostomídeo

Legenda: E= Epitaciolândia; A= amostra A; B= amostra B.

As imagens de alguns ovos encontrados nas amostras do estudo estão representadas nas Figuras 12, 13 e 14.

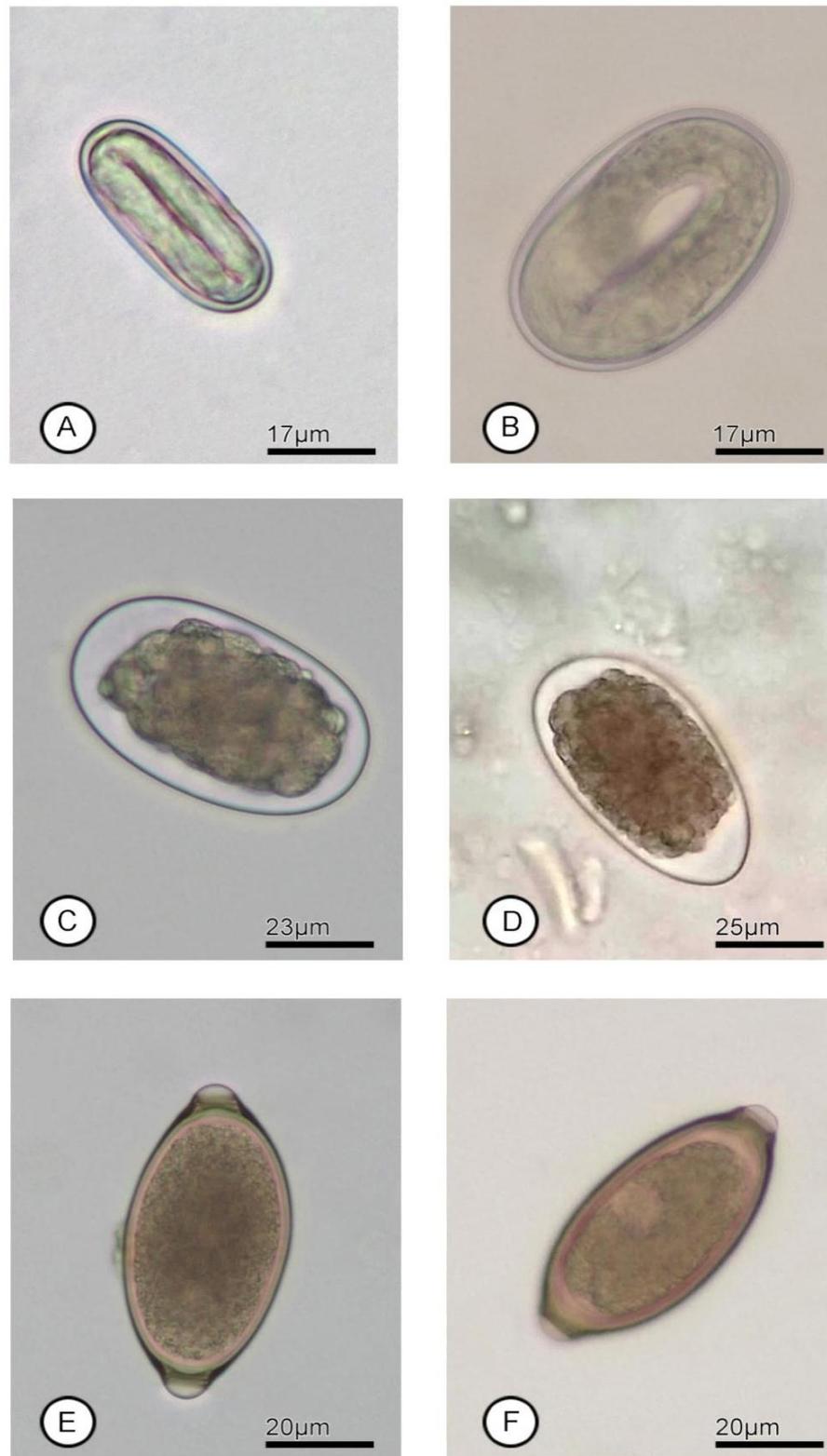
Figura 12 - Ovos de cestódeos encontrados nas amostras de fezes



Legenda: A- Setas: ovos de tenídeo (amostra 01-RB-B); B, C e D- Ovos de tenídeo. Setas: acúleos da oncosfera (amostra 01-RB-B); E e F- Ovos de *Vampirolepis nana*. Setas maiores: acúleos da oncosfera. Setas menores: filamentos polares.

Fonte: Tratamento de imagem realizado por Ricardo Schmidt do Serviço de Produção e Tratamento de Imagem – IOC/Fiocruz-RJ.

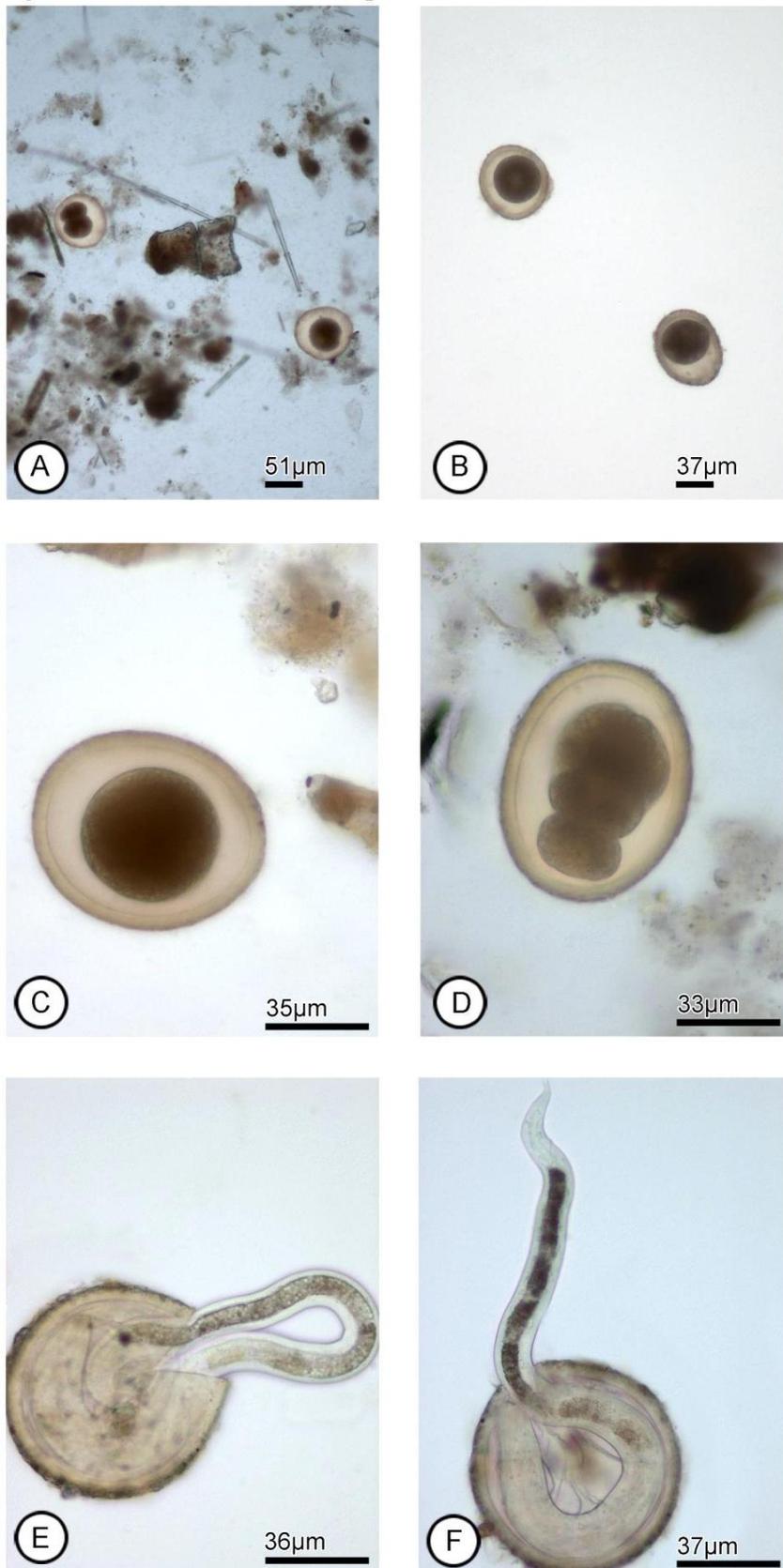
Figura 13 - Ovos de nematódeos encontrados nas amostras de fezes



Legenda: A- Ovo de *Spirocerca lupi*; B- Ovo embrionado de ancilostomídeo; C e D- Ovos de ancilostomídeos no início da segmentação; E e F- Ovos de *Trichuris* sp..

Fonte: Tratamento de imagem realizado por Ricardo Schmidt do Serviço de Produção e Tratamento de Imagem – IOC/Fiocruz-RJ.

Figura 14 - Ovos de *Toxocara* sp. encontrados nas amostras de fezes



Legenda: A, B, C e D- Ovos de *Toxocara* sp. em diferentes estágios de embrionamento; E e F- Ovos de *Toxocara* sp. em eclosão.

Fonte: Tratamento de imagem realizado por Ricardo Schmidt do Serviço de Produção e Tratamento de Imagem – IOC/Fiocruz-RJ.

3.3 Análise morfométrica dos ovos

As médias das dimensões considerando comprimento e largura de todos os ovos de helmintos encontrados nos estudo estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultado da análise morfométrica dos ovos de helmintos encontrados

Táxons	Médias das dimensões (μm)	
	comprimento total	largura total
Ancilostomídeos	$60,0 \pm 1,2$	$38,0 \pm 1,1$
<i>Toxocara</i> sp.	$71,6 \pm 1,4$	$72,3 \pm 1,3$
Tricurídeos*	$65,0 \pm 2,9$	$32,1 \pm 5,3$
<i>Spirocerca lupi</i> **	54,4	17,0
<i>Vampirolepis nana</i>	$57,5 \pm 0,6$	$52,5 \pm 0,6$
Tenídeos	$31,0 \pm 0,8$	$27,5 \pm 0,7$

Legenda: * medidas obtidas compatíveis com ovos de *Trichuris* sp.; ** foi encontrado apenas um ovo na amostra 02-RB-A.

3.4 Extração e quantificação do dna total dos sedimentos fecais

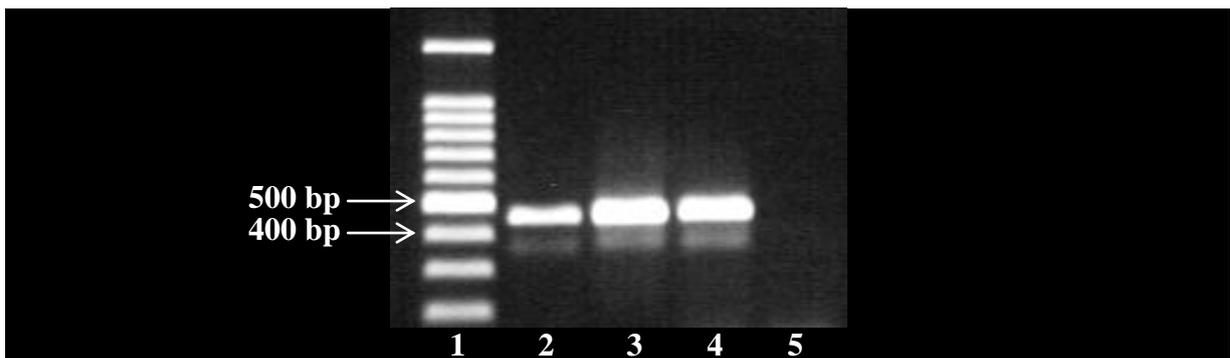
Os resultados do rendimento de DNA obtido após extração do sedimento fecal variaram entre 2,1 e 101,7 ng/ μL considerando todas as amostras do estudo (n=80).

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

3.5.1 Reprodutibilidade do protocolo da PCR

A Figura 15 mostra a imagem da foto-documentação de um gel de agarose a 1% com os resultados obtidos para o teste da reprodutibilidade da PCR. Os sinais de amplificação para as amostras controles utilizadas foram os esperados de acordo com a visualização do amplicons obtidos na região entre 400 e 500 bp (450 bp).

Figura 15 – Resultados do teste de reprodutibilidade da PCR

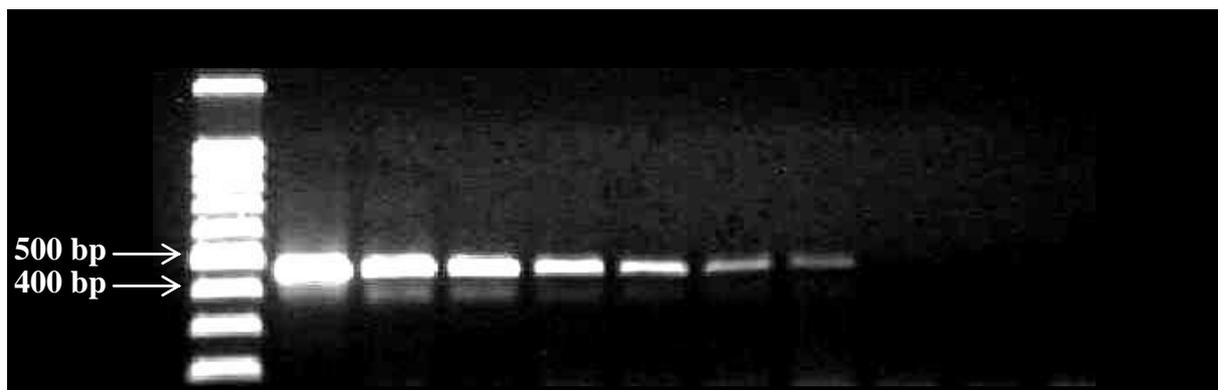


Legenda: (1) Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder; (2) Controle: DNA de *E. ortleppi* (0,085 ng/ μ L); (3) e (4) Controles: DNA de *E. granulosus* s.s. (0,307 ng/ μ L); (5) Controle: reação com ausência de DNA.

Nota: Amplicons (450 bp) da PCR corados com GelRed em gel de agarose a 1%.

3.5.2 Sensibilidade do protocolo da PCR

A Figura 16 mostra a imagem da foto-documentação de um gel de agarose a 1% com os resultados obtidos para o teste de sensibilidade da PCR. Foram visualizados os sinais de amplificação esperados (amplicons obtidos na região entre 400 e 500 bp) para a faixa entre 0,000006 e 6,600 ng/ μ L de concentração final de DNA controle (*E. granulosus* s.s.) utilizado.

Figura 16 – Resultados do teste de sensibilidade da PCR (DNA de *E. granulatus* s.s.)

Amplicons (450 bp) da PCR corados com GelRed em gel de agarose a 1%; Legenda: (1)

Legenda: Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder; (2) 6,600 ng/μL de DNA; (3) 0,660 ng/μL de DNA; (4) 0,066 ng/μL de DNA; (5) 0,006 ng/μL de DNA; (6) 0,0006 ng/μL de DNA; (7) 0,00006 ng/μL; (8) 0,000006 ng/μL de DNA; (9) 0,0000006 ng/μL de DNA; (10) 0,00000006 ng/μL de DNA; (11) Controle: reação com ausência de DNA.

Nota: Amplicons (450 bp) da PCR corados com GelRed em gel de agarose a 1%.

3.5.3 PCR com as amostras do estudo

Das 75 amostras oriundas do Acre, 06 (8,0%) foram positivas na PCR (01 de Sena Madureira, 01 de Rio Branco, 03 de Xapuri e 01 de Epitaciolândia), incluindo a amostra coletada em Rio Branco onde ovos de tenídeo foram encontrados. Os resultados da PCR com as amostras do estudo estão descritos na Tabela 15, enquanto informações sobre os pontos de coleta somente das amostras positivas na PCR estão reunidas na Tabela 16.

Tabela 15 – Localidade e quantitativo de amostras positivas e negativas na PCR

Município	Resultado da PCR		Total de amostras (n=75)
	Positivo (n=6 / 8%)	Negativo* (n=69 / 92%)	
Sena Madureira	1 (7,14%) ***	13 (92,86%)	14
Rio Branco	1 (16,67%)**	5 (83,33%)	6
Bujari	-----	7 (100,0%)	7
Xapuri	3 (8,33%) ***	33 (91,67%)	36
Epitaciolândia	1 (8,33%) ***	11 (91,67%)	12

Legenda: * resultado preliminar; ** amostra positiva apenas na PCR com a utilização do volume de 3,0 μL do conteúdo de DNA total extraído; *** amostras positivas apenas na PCR com a utilização do volume de 6,0 μL do conteúdo de DNA total extraído.

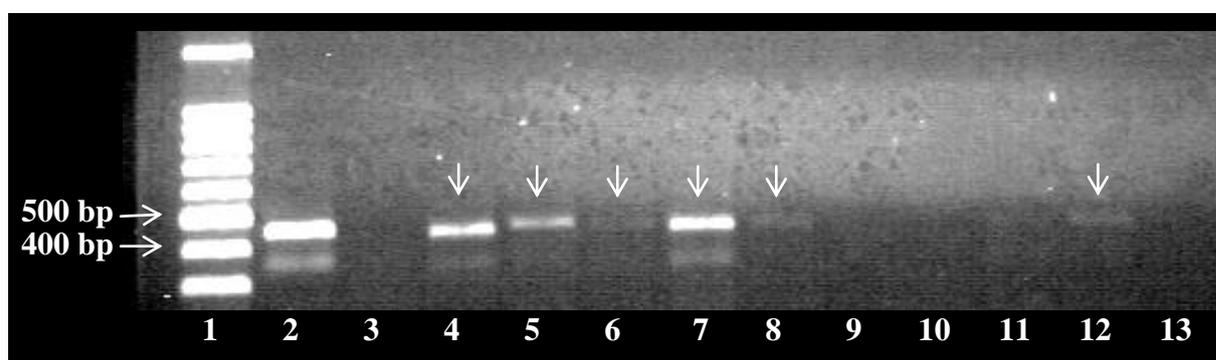
Tabela 16 - Informações sobre as amostras positivas na PCR

Município	Identificação da amostra (n=6)	Ponto de coleta (P)	Nº de Cães (n=14)	Nº de pessoas (n=28)	Tipo de área	Alimentação com vísceras*
Sena Madureira	18-SM-A	P1	3	4	assentamento	sim
Rio Branco	01-RB-B***	P4	4	****	fazenda	não**
Xapuri	09-X-C	P11	2	3	assentamento	sim
	29-X-A	P31	1	6	seringal	sim
	31-X-A	P33	3	7	seringal	sim
Epitaciolândia	33-E-A	P35	1	3	seringal	sim

Legenda: SM= Sena Madureira; RB= Rio Branco; X=Xapuri; E= Epitaciolândia; A= amostra A; B=amostra B; C=amostra C; * alimentação dos cães com vísceras cruas de animais de caça, incluindo pacas; ** relato do acesso dos cães às carcaças de animais de produção (bovinos e ovinos); *** amostra com ovos de tenídeo; **** pelo menos 5 pessoas residiam na propriedade, com exceção dos funcionários.

A Figura 17 apresenta a imagem da foto-documentação de um gel de agarose a 1% com os resultados obtidos na PCR com as amostras do estudo. Os sinais de amplificação para as amostras positivas foram os esperados de acordo com a visualização do amplicons obtidos na região entre 400 e 500 bp (450 bp). Os resultados obtidos com algumas amostras negativas do estudo também estão representados na Figura 17 e as demais amostras negativas mantiveram o mesmo padrão de resultado, com ausência de sinais de amplificação no gel.

Figura 17 – Resultados da PCR com as amostras do estudo



Legenda: (1) Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder; (2) Controle positivo: DNA de *E. granulosus* s.s. (0,460 ng/μl); (3) Controle negativo: reação com ausência de DNA; (4) Amostra 29-X-A; (5) Amostra 31-X-A; (6) Amostra 33-E-A; (7) Amostra 09-X-C; (8) Amostra 01-RB-B; (9) Amostra 10-B-A; (10) Amostra 11-B-A; (11) Amostra 11-B-B; (12) Amostra 18-SM-A; (13) Amostra 01-RJ-A.

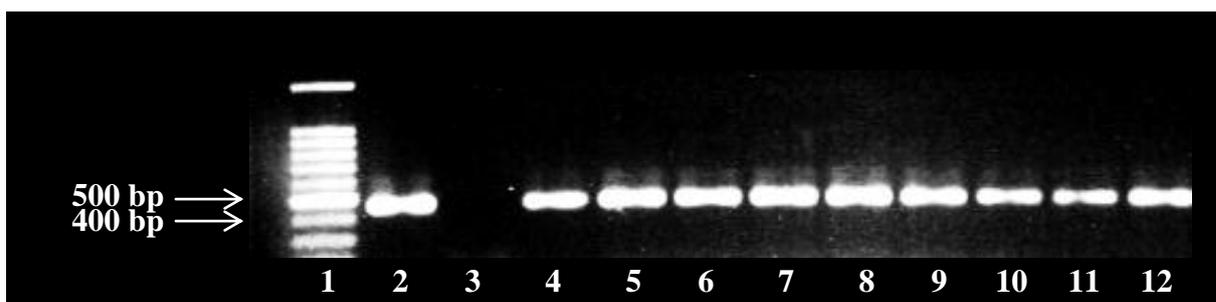
Nota: Amplicons (450 bp) da PCR (setas) corados com GelRed em gel de agarose a 1%.

3.5.4 PCR de contraprova após *spiking* com as amostras negativas

Todas as amostras do estudo supostamente negativas na PCR (n=69) e as amostras provenientes do Rio de Janeiro (n=05) foram positivas na nova PCR realizada após *spiking* (PCR de contraprova). Elas foram consideradas originalmente negativas.

A Figura 18 demonstra a imagem da foto-documentação de um gel de agarose a 1% com os resultados obtidos para as amostras analisadas na PCR de contraprova. Os sinais de amplificação para as amostras foram os esperados de acordo com a visualização do amplicons obtidos na região entre 400 e 500 bp (450 bp) e as outras amostras do estudo (não representadas na figura 18) mantiveram o mesmo padrão de resultado.

Figura 18 – Resultados da PCR de contraprova após *spiking*



Legenda: (1) Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder; (2) Controle positivo: DNA de *E. granulosus* s.s. (0,921 ng/μl); (3) Controle negativo: reação com ausência de DNA; (4) Amostra 35-SM-A; (5) Amostra 73-SM-A; (6) Amostra 74-SM-A; (7) Amostra 75-SM-A; (8) Amostra 76-SM-A; (9) Amostra 77-SM-A; (10) Amostra 78-SM-A; (11) Amostra 80-SM-A; (12) Amostra 119-SM-A.
Nota: Amplicons (450 bp) da PCR corados com GelRed em gel de agarose a 1%.

3.6 Sequenciamento automático

Dentre as 06 amostras positivas na PCR, os resultados do sequenciamento automático envolvendo 02, demonstraram seqüências de nucleotídeos compatíveis (100% de identidade) com as espécies *E. vogeli* e *E. granulosus* s.s. (G1) na comparação com seqüências de referência depositadas no GenBank. As outras seqüências restantes (n=04) não tiveram suas identidades biológicas confirmadas por não demonstrarem qualquer percentual de homologia com as seqüências de *Echinococcus* sp. ou níveis de identidade confiáveis com quaisquer seqüências depositadas relacionadas a outros organismos.

As Figuras 19 e 20 apresentam as sequências de nucleotídeos compatíveis com espécies do gênero *Echinococcus* obtidas nas amostras do estudo, com relação às amostras 18-SM-A e 01-RB-B, respectivamente.

As Tabelas 17 e 18 reúnem, respectivamente, informações da análise realizada na ferramenta BLAST sobre o nível de similaridade entre as sequências obtidas nas amostras do estudo 18-SM-A e 01-RB-B com as sequências de *Echinococcus* sp. depositadas no GeneBank. O DNA detectado na amostra fecal 18-SM-A foi compatível com 04 sequências de *E. vogeli* do GeneBank enquanto que o da amostra 01-RB-B foi compatível com pelo menos 100 sequências referentes ao *E. granulosus* s.s. (G1).

A Figura 21 demonstra o resultado da análise obtida por meio da ferramenta BLAST sobre o nível de similaridade entre as sequências obtidas nas amostras do estudo (18-SM-A e 01-RB-B), o qual foi de 92%.

Figura 19 - Sequência (425 bp) de parte do gene mitocondrial COX1 do DNA de *E. vogeli* detectado na amostra 18-SM-A de Sena Madureira (Ponto de coleta 1)

1	ATCCTGAGGT	TTATGTGTTA	ATTTTGCCTG	GGTTTGGTAT	AATTAGTCAT
51	ATATGTTTGA	GGGTTAGTGC	TAATTTGGAT	GTGTTTGGTT	TTTATGGGTT
101	ATTGTTTGCT	ATGTTTTCTA	TAGTATGTTT	AGGAAGTAGG	GTTTGAGGGC
151	ATCATATGTT	TACTGTTGGG	TTGGATGTGA	AGACGGCTGT	TTTTTTTAGT
201	TCTGTTACTA	TGATTATAGG	GGTTCCTACT	GGTATAAAGG	TGTTTACTTG
251	GTTGTATATG	TTGTTGAATT	CGAGTGTGAA	TAAGGGTGAT	CCGGTTTTAT
301	GGTGAGTGGT	TTCTTTTATA	GTGTTGTTTA	CGTTTGGTGG	TGTTACTGGT
351	ATAGTTTTGT	CTGCTTGTGT	ATTGGATAAT	GTTTTGCATG	ATACTTGGTT
401	TGTGGTAGCT	CATTTTCATT	ATGTT		

Figura 20 - Sequência (424 bp) de parte do gene mitocondrial COX1 do DNA de *E. granulosus* s.s. (G1) detectado na amostra 01-RB-B de Rio Branco (Ponto de coleta 4)

1	ATCCTGAGGT	TTATGTGTTG	ATTTGCCTG	GATTTGGTAT	AATTAGTCAT
51	ATTTGTTTGA	GTATTAGTGC	TAATTTTGAT	GCGTTTGGGT	TCTATGGGTT
101	GTTGTTTGCT	ATGTTTTCTA	TAGTGTGTTT	GGGTAGCAGG	GTTTGGGGTC
151	ATCATATGTT	TACTGTTGGG	TTGGATGTGA	AGACGGCTGT	TTTTTTAGC
201	TCTGTTACTA	TGATTATAGG	GGTTCCTACT	GGTATAAAGG	TGTTTACTTG
251	GTTATATATG	TTGTTGAATT	CGAGTGTTAA	TGTTAGTGAT	CCGGTTTTGT
301	GATGGGTTGT	TTCTTTTATA	GTGTTGTTTA	CGTTTGGGGG	AGTTACGGGT
351	ATAGTTTTGT	CTGCTTGTGT	GTTAGATAAT	ATTTTGCATG	ATACTTGGTT
401	TGTGGTGGCT	CATTTTCATT	ATGT		

Tabela 17 – Similaridade entre a sequência obtida na amostra 18-SM-A com sequências de *E. vogeli* depositadas no GenBank

Identificação da amostra	Similaridade*	Referências no GeneBank (n=4)	Agente biológico
18-SM-A	100%	KM588226.1	
	99%	AB208546.1	<i>Echinococcus</i>
	99%	JX315616.1	<i>vogeli</i>
	99%	M84670.1	

Legenda: * percentual de identidade entre a sequência do estudo com a(s) sequência(s) mais similar(es) depositada(s) no GeneBank.

Tabela 18 – Similaridade entre a sequência obtida na amostra 01-RB-B com sequências de *E. granulosus* s.s. (G1) depositadas no GenBank

Identificação	Similaridade* /	Referências no GenBank **
---------------	-----------------	---------------------------

da amostra	Agente biológico	
01-RB-B	100% / <i>Echinococcus Granulosus</i> s.s. (G1)	KR337824.1; KR337821.1; KR337819.1; KR905709.1; KT382540.1; AB893250.1; AB893249.1; AB893248.1; AB893245.1; AB893244.1; AB777908.1; AB777907.1; AB777904.1; AB787547.1; AB787545.1; AB787544.1; AB787543.1; AB787542.1; AB787541.1; AB787540.1; AB787536.1; AB787533.1; HF947595.1; HF947556.1; HF947574.1; HF947566.1; HF947558.1; HF947554.1; HF947557.1; HF947555.1; HF947553.1; KC660075.1; AB786664.1; JX854029.1; AB688621.1; AB688617.1; AB688616.1; AB688614.1; AB688611.1; AB688610.1; AB688609.1; AB688608.1; AB688607.1; AB688603.1; AB688602.1; AB688598.1; AB688597.1; AB688596.1; AB688594.1; AB688591.1; AB688590.1; AB688141.1; JQ250816.1; JQ250815.1; JQ250806.1; JQ219963.1; AB622277.1; FN646371.1; FN646369.1; FN646368.1; FN646367.1; FN646366.1; FN646365.1; FN646364.1; FN646358.1; FN646357.1; FN646355.1; HM598451.1; AY389989.1; AY377836.1; DQ356883.1; EF367275.1; EF367273.1; EF367272.1; EF367271.1; EF367267.1; AB893243.1; KY446001.1; KR337820.1; KP751431.1; KM100575.1; KM100574.1; KM100573.1; AB893251.1; AB893242.1; KJ162568.1; KJ162563.1; KJ162562.1; AB787548.1; AB787538.1; AB787532.1; AB787531.1; HF947592.1; HF947576.1; HF947567.1; HF947559.1; KC109659.1; JX854030.1; AB688620.1; AB688618.1.

Legenda: * percentual de identidade entre a sequência do estudo com a(s) sequencia(s) mais similar(es) depositada(s) no GenBank; ** estão representadas pelo menos 100 sequencias de *E. granulosus* (genótipo 1) depositadas.

Figura 21 - Análise realizada no BLAST-NCBI após alinhamento entre as sequências compatíveis com *Echinococcus* sp. obtidas nas amostras 18-SM-A e 01-RB-B

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
595 bits(322)	8e-175	390/424(92%)	0/424(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATCCTGAGGTTTATGTGTTAAATTTGCCTGGGTTGGTATAAATTAGTCATATAATGTTTGA			60
Sbjct 1				
Query 61	GGGTTAGTGCTAAATTGGATGTTGGTTTTTATGGGTTATTTGCTATGTTTTCTA			120
Sbjct 61				
Query 121	TAGTATGTTTAGGAAAGTAGGTTTGAGGGCAATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTA			180
Sbjct 121				
Query 181	AGACGGCTGtttttAGTCTGTTACTATGATATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGG			240
Sbjct 181				
Query 241	TGTTTACTTGGTTGTATATGTTGTTGAATTCGAGTGTGAATAAGGGTGATCCGGTTTTAT			300
Sbjct 241				
Query 301	GGTGAGTGGTTCTTTTATAGTGTGTTTACGTTTGGTGGTGTACTGGTATAGTTTTGT			360
Sbjct 301				
Query 361	CTGCTTGTGTTGGATAAATGTTTTGCATGATACTTGGTTTGTGGTAGCTCATTTTCATT			420
Sbjct 361				
Query 421	ATGT 424			
Sbjct 421				
Query 421	ATGT 424			

Legenda: Query = amostra 18-SM-A (sequência de *E. vogeli*); Sbjct = amostra 01-RB-B (sequência de *E. granulosis* s.s./genótipo 1); Traço = similaridade na posição; Ausência do traço = discrepância na posição.

As Figuras 22, 23, 24 e 25 demonstram as sequências de nucleotídeos obtidas nas amostras do estudo que não foram compatíveis com as sequências de *Echinococcus* sp. do GenBank, com relação às amostras 09-X-C, 29-X-A, 31-X-A e 33-E-A, respectivamente.

Figura 22 - Sequência de parte (415 bp) do gene mitocondrial COX1 do DNA detectado na amostra 09-X-C de Xapuri (Ponto de coleta 11)

1	CCTGAGGTTT	ATATTTCAAGT	TATTCCTGGC	TTTGGTATTG	TCAGTCATGT
51	AATTTCTACT	TTTTCTCAGA	AACGTATTTT	TGGTCATACT	TCAATGATAG
101	CTGCTATTAT	TATTATTGGA	ATAATTGGAT	TTATTGTATG	GGCACATCAT
151	ATGTATACTT	CTGGTATTGA	TACAAATACA	AAAGCTTATT	TFACTTCTGC
201	TACAATGGTT	ATTGCTATTC	CAACAGGGAT	AAAAATATTT	AATTGGTTAG
251	CAACTATGTG	GGGAGGTAAGT	ATTTGGTTTT	ATACACCTAT	GTATTTTGCA
301	ATTGGTTTTG	TTGCTTTATT	TACTATGGGT	GGATTGACAG	GTATAATCCT
351	TTCTAATGCA	GGTATTGATG	TTTCTTTACA	TGATACTTAT	TATGTTGTTG
401	CACATTTTCA	TTATG			

Figura 23 - Sequência (416 bp) de parte do gene mitocondrial COX1 do DNA detectado na amostra 29-X-A de Xapuri (Ponto de coleta 31)

1	TCCTGAGGTT	TATATATTAA	TTTTACCTGC	TTTTGGTATC	GTTAGCCAAA
51	TTATTGGTAC	CTTTTCTAAT	AAGTCCATTT	TTGGTTATAT	TGGAATGGTG
101	TACGCAATGT	TATCTATAGC	TGTTCTAGGA	TTTATAGTTT	GGGCTCATCA
151	TATGTATACT	GTTGGTTTAG	ATGTTGATAC	TCGTGCTTAC	TTTACAGCAG
201	CTACTATGAT	GATTGCTGTT	CCGACTGGAA	TTAAAATCTT	TAGTTGGATA
251	GCAACCTTGT	GAGGAGGCCA	AATAGTACGC	AAAACCCAC	TACTTTTTGT
301	TATAGGTTTT	CTCGTATTGT	TTACGTTAGG	GGGTTTAACT	GGAATAGTCT
351	TATCTAACGC	AGGTCTTGAT	ATTATGTTAC	ACGATACTTA	TTATGTTGTG
401	GCCCATTTTC	ATTATG			

Figura 24 - Sequência (427 bp) de parte do gene mitocondrial COX1 do DNA detectado na amostra 31-X-A de Xapuri (Ponto de coleta 33)

1	ATCCTGAGGT	TTATATTTTA	ATTTTACCAG	CGTTTGGGTA	TTATAAGTCA
51	TGTAATACAA	TACGAATCGC	GTACAATGGT	TTTTGAGATA	TTTAGGTATG
101	GTTTATGCTA	TTATTTCTAT	TGGTATTTTG	GGTTTTAGTT	GTTTGGGCGC
151	ACCATATGTA	TACCGTTGGC	ATGGATGTTG	ATACACGTGC	TTAATTTTAC
201	AGCAGCTACT	ATGATTATAG	CTGGTTCCTA	CAGGTATCAA	AGTTTTTAGT
251	TGGTTAGCAA	ACTTTATGGG	GTGGTTTAAT	TAATTGGAGA	AGCTGCCCAA
301	AGTTTCGCAT	TGGGCTTTGT	GTTGCTATTC	ACCATTGGAG	GATTAAGTGG
351	TGTTGTTCTA	GCAAATGGCT	GGTTTGGATG	TAGCTTTACA	TGATAGCTTA
401	TTATGTAGTT	GCCCATTTTC	ATTATGT		

Figura 25 - Sequência (417 bp) de parte do gene mitocondrial COX1 do DNA detectado na amostra 33-E-A de Epitaciolândia (Ponto de coleta 35)

1	TGAGGTTTAT	ATAATTATAT	TGCCAGCTTT	TGGTGTTATT	AGTCAGGTAA
51	TATCTACTTA	TGCCCGCCGG	ACCAATTTTT	GGATATTTGG	GTATGGTTTA
101	TGCTATGATT	TCTATAGGTG	TACTTGGTTT	TATAGTTTGG	GCGCACCATA
151	TGTATACTGT	TGGTTTGGAT	GGTTGATACA	CGTGCTTATT	TTACAGCAGC
201	TACTATGATT	ATAGCTGTGC	CTACAGGTAT	AAAAGTGTTT	AGTTGGTTAG
251	CTACATTGTG	GGGCGGTTAT	TTAACTATGA	CAACTCCTTT	TGTTATTTGC
301	CTTGGGTTTT	TTGGTTTTGT	TTACAATAGG	TGGGCTTACT	GGTATTATTT
351	TGAGTAATGC	TGGCTTAGAT	ATAGCTTTGC	ATGATACTTA	TTATGTAGTT
401	GCGCATTTTC	ATTATGT			

4 DISCUSSÃO

A contaminação do solo com helmintos parasitos apresenta grande perigo para a saúde coletiva e continua a ser um problema importante nos países em desenvolvimento (PAPINI et al., 2012; TRAVERSA et al., 2014). Do ponto de vista epidemiológico, a contaminação do ambiente com as fezes de cães domésticos e elementos parasitários infectantes, como ovos e larvas de helmintos, tem sido apontada como uma das principais fontes de infecções humanas (TRAVERSA et al., 2014). Estudos já demonstraram uma correlação positiva entre a contaminação do solo por helmintos e a presença de cães e fezes no ambiente, além de assinalarem que os locais mais contaminados são aqueles com maior circulação desses animais (CASSENOTE et al., 2011; SPRENGER et al., 2014).

O presente estudo demonstrou contaminação ambiental por fezes de cães em todos os pontos de coleta e um percentual de 36% (27/45) de amostras contaminadas por ovos de helmintos em 23 (52,27%) deles. Taxas de contaminação iguais ou superiores também foram observadas em outros estudos realizados no Brasil, como, por exemplo, em amostras ambientais recolhidas no Rio de Janeiro (BRENER et al., 2008; CORONATO et al., 2012), Santa Catarina (PEDRASSANI et al., 2008), Alagoas (OLIVEIRA et al., 2011), São Paulo (CASSENOTE et al., 2011; MARQUES et al., 2012) e Paraná (SPRENGER et al., 2014).

Os resultados também confirmaram que os cães domésticos do Acre são hospedeiros de helmintos com potencial zoonótico, como acontece com cães de outras regiões do país e do mundo (DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2014; SUDAN et al., 2015; TORRES-CHABLÉ et al., 2015). Os dados estão de acordo com a maior ocorrência de alguns táxons, tais como Ancylostomatidae, *Toxocara* sp. e *Trichuris* sp. (SCAINI et al., 2003; CAMPOS FILHO et al., 2008; KATAGIRI & SEQUEIRA., 2008; THOMÉ et al., 2009; CORONATO et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2012; MOURA et al., 2013; SPRENGER et al., 2014; DIAZ et al., 2015; TORRES-CHABLÉ et al., 2015; TUN et al., 2015). Uma ênfase deve ser dada sobre a importância destes resultados devido ao número de pessoas residindo e utilizando intensamente as áreas peridomiciliares nestes locais. Oliveira-Arbex et al. (2016), por exemplo, sinalizam para o risco em potencial do desenvolvimento de larva migrans cutânea e larva migrans visceral por proprietários de cães domésticos em Pratânia, município do interior de São Paulo, quando encontraram positividade em 67,3% (187/278) das amostras de fezes de cães, com destaque para 56,6% delas contendo ovos de ancilostomídeos e 11,9% com ovos de *Toxocara* sp.

O poliparasitismo em cães domésticos do Acre foi demonstrado, porém infecções helmínticas por táxons individuais também foram as mais comuns relatadas em estudos atuais que envolveram a análise de fezes de cães na Malásia (NGUI et al., 2014) e na Índia (SUDAN et al., 2015).

Embora não se conheça o seu potencial zoonótico, ovos de *S. lupi* também foram encontrados com baixa prevalência nas fezes de cães no Iran (GHOLAMI et al., 2011), Itália (GIANNELLI et al., 2014), Brasil (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002; FONSECA et al., 2012) e Índia (SUDAN et al., 2015). O sarcoma esofágico, associado com o desenvolvimento prévio da espirocercose, é a consequência em potencial mais grave da infecção por *S. lupi* (SHIPOV et al., 2015) e os cães domésticos da fazenda em Rio Branco onde a amostra com o *S. lupi* foi encontrada, podem estar sob o risco de desenvolvimento da doença.

V. nana, cestódeo parasito de roedores, humanos e outros primatas, não costuma utilizar canídeos como hospedeiros definitivos (WOOLAND, 1924), porém, ovos do helminto foram encontrados em uma única amostra fecal do presente trabalho. Estudos envolvendo amostras fecais de lobos (*Canis simensis*) da Etiópia (VAN KESTEREN et al., 2015) e de raposas do Ártico (ELMORE et al., 2013) também encontraram ovos do parasito em uma de suas amostras e sugeriram contaminação do material analisado por ovos eliminados pelos hospedeiros definitivos ou pela ingestão de roedores infectados pelos canídeos.

Nesse estudo, ovos de tenídeos também foram encontrados em uma única amostra fecal, o que está de acordo com trabalhos com cães domésticos do Japão (YAMAMOTO et al., 2006), Suíça (SAGER et al., 2006) e Eslováquia (ANTOLOVA et al., 2009) e com canídeos silvestres (Graxaim-do-campo - *Lycalopex gymnocercus*) da Argentina (SCIOSCIA et al., 2013).

Inúmeros estudos já demonstraram o encontro de ovos de tenídeos que foram identificados como *Echinococcus* em amostras fecais de cães domésticos no Cazaquistão e Espanha (TRACHSEL et al., 2007), China (YU et al., 2008), Quirguistão (ZIADNOV et al., 2008), Eslováquia (ANTOLOVA et al., 2009), Japão (NONAKA et al., 2009), Alemanha (DYACHENCO et al., 2008), Lituânia (BRUZINSKAITE et al., 2009), Canadá (HIMSWORTH et al., 2010b) e Suíça (NAGY et al., 2011).

Embora o Brasil seja área endêmica das equinococoses cística e policística, são escassos os estudos realizados na região Sul para a investigação da presença de *E. granulosus* s.l. em caninos (FARIAS et al., 2004; de LA RUE et al., 2011; SANTOS et al., 2012) e o papel dos cães domésticos na transmissão do parasito *E. vogeli* na região Norte do país ainda não havia sido investigado. Nesta região estão presentes os fatores epidemiológicos

que caracterizam a área endêmica de equinococose policística, tais como cachorro vinagre (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008; SOARES et al., 2014) e pacas infectados (MENEGHELLI et al., 1990; ALMEIDA et al., 2013) e pacientes com histórico de caça como subsistência e o hábito da alimentação dos cães domésticos com vísceras cruas de pacas (MENEGHELLI et al., 1986; SIQUEIRA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2013).

A metodologia proposta e os resultados obtidos estão enquadrados nos estudos atuais sobre PCR pois a associação com sequenciamento automático e a comparação com as sequências genéticas depositadas no GenBank permite a identificação de *Echinococcus* spp., conforme estudos epidemiológicos realizados em canídeos da Argentina (SORIANO et al., 2010), Canadá (HIMSWORTH et al., 2010a,b), China (WANG et al., 2010; VANISCOTTE et al., 2011), Irã (BEIROMVAND et al., 2011), Kosovo (SHERIFI et al., 2011), Suíça (NAGY et al., 2011), França (UMHANG et al., 2012), Estônia (LAURIMAA et al., 2015), Palestina (AL-JAWABREH et al., 2015) e Tunísia (CHAÂBANE-BANAOUES et al., 2015).

O kit empregado para a extração de DNA total das fezes (QIAamp DNA Stool Mini Kit - QIAGEN - Alemanha) permitiu a realização da PCR e a posterior identificação de *Echinococcus* sp., estando de acordo com estudos que envolveram a análise de amostras fecais de cães domésticos do Quênia (ABBASI et al., 2003) e da China (MOSS et al., 2013), além de cães domésticos e canídeos silvestres do Iran (MOBEDI et al., 2013).

Se forem considerados os estudos da PCR associada a amplificação do gene COX1, os resultados estão de acordo com estudos realizados em fezes de cães domésticos do Japão (NONAKA et al., 2009) e da Lituânia (BRUZINSKAITE et al., 2009), onde a caracterização dos ovos de tenídeos revelou *E. multilocularis* e os genótipos 6 e 7 de *E. granulosus*.

A obtenção de quatro sequências de organismos cuja identidade biológica não foi elucidada demonstra a possibilidade de detecção de organismos não-*Echinococcus* pela PCR associada ao marcador COX1, reforçando a dependência do sequenciamento automático como complemento da metodologia. Por outro lado, os resultados demonstram uma característica do marcador não revelada em estudos anteriores, talvez pela sua maior e mais frequente utilização na caracterização de vermes adultos ou metacestóides de *Echinococcus* sp. (SANCHEZ et al., 2010; de LA RUE et al., 2011; SANTOS et al., 2012; SOARES et al., 2014; STIJNIS et al., 2015), sendo, portanto, pouco utilizado para a detecção em amostras de fezes ou ambientais (CABRERA et al., 2002; NONAKA et al., 2009; BRUZINSKAITE et al., 2009).

Poucos trabalhos relacionados à detecção de *Echinococcus* sp. em amostras fecais de canídeos relataram a utilização do *spiking* como controle de inibição da PCR para a

verificação de resultados falso-negativos (DINKEL et al., 1998; ABBASI et al., 2003). Outros estudos admitem resultados inconclusivos quando a PCR se mantém negativa após a realização dos procedimentos de controle de inibição (DINKEL et al., 1998). Nossos resultados demonstram a obtenção de sinais de amplificação do gene COX1 em todas as amostras negativas ao empregar DNA conhecido de *E. granulosus* s.s. em concentração 10 vezes menor (0,10 ng) do que o adotado por Dinkel et al. (1998), porém, os autores utilizaram a PCR direcionada para o gene mitocondrial 12S rRNA. Abbasi et al. (2003) também verificaram todas as amostras fecais negativas do estudo com cães do Quênia e da Jordânia quanto à inibição da PCR e nenhuma delas foi capaz de inibir a reação após a realização do *spiking*, sendo verdadeiramente negativas.

É importante assinalar que a amostra positiva (18-SM-A) de *E. vogeli* foi de um dos três cães habitantes de um assentamento da área Floresta Estadual do Antimary no município de Sena Madureira, que eram alimentados com vísceras cruas provenientes de caça, incluindo a de pacas. Dados prévios desse município mostram a ocorrência de casos clínicos de equinococose policística e indivíduos com sorologia positiva em áreas urbanas e rurais de Sena Madureira (PASTORE et al., 2003a,b), além de pacas infectadas (ALMEIDA et al., 2013). O presente estudo demonstra um risco potencial de transmissão da equinococose policística, a partir da contaminação do ambiente com as fezes do animal infectado.

A dificuldade revelada na análise microscópica de materiais fecais considerando a eliminação frequentemente baixa e irregular dos ovos de *Echinococcus* sp. nas fezes dos hospedeiros (ECKERT et al., 2001a), associada ao fato da amostra 18-SM-A não ter sido analisada a fresco ou até mesmo não ter sido preservada em formalina a 10%, pode ter influenciado na ausência de ovos de tenídeos na observação microscópica, porém, esse resultado pode ter sido superado pelo fato de alguns protocolos de PCR revelarem a capacidade de detecção de DNA de *Echinococcus* sp. a partir de único ovo (um ovo contém cerca de 8 pg de DNA), quantidade passível de escapar ao exame no microscópio (DINKEL et al., 1998).

Um resultado inesperado foi o encontro de uma amostra (01-RB-B) positiva para o genótipo 1 de *E. granulosus* s.s.. A distribuição geográfica conhecida e atribuída ao parasito e a equinococose cística estão relacionadas com regiões de intensiva criação de animais de produção situadas na fronteira do Brasil com a Argentina e Uruguai (LARRIEU & ZANINI, 2012). Ao que parece, os fatores de risco da cadeia epidemiológica da equinococose cística estão presentes, pois desde a década de 70 o desenvolvimento da agropecuária, em particular de bovinos e ovinos tem sido observado em municípios do Acre (PRADO & RIBEIRO,

2011). O deslocamento do gado de outras regiões pode ter introduzido o genótipo 1 que é o mais comum de *E. granulosus* s.l. (CUCHER et al., 2015). Dados da literatura indicam que os cães com acesso mais fácil ao gado, são aqueles que se tornam infectados (OTERO-ABAD & TORGERSON, 2013).

De fato, a amostra positiva para *E. granulosus* s.s. (G1) nesse estudo era de uma fazenda (localizada no interior de Rio Branco na divisa com o município de Porto Acre) onde pelo menos dois cães tinham circulação fácil à área peridomiciliar, com o relato do acesso e ingestão de vísceras dos animais de produção (bovinos e ovinos) abatidos ou mortos naturalmente, além do histórico de criação de animais oriundos de outras partes do Brasil. Esse pode ter sido um mecanismo de infecção pelo *E. granulosus* s.s. (G1) e a contaminação do ambiente com as fezes desses cães pode expor as pessoas a esse genótipo que é o mais comum em animais e humanos sendo o responsável pela maior carga global de casos de equinococose cística (HIMSWORTH et al., 2010a,b; CUCHER et al., 2015).

Outros estudos também detectaram genótipos de *E. granulosus* s.l. em amostras de fezes de cães domésticos como, por exemplo, G1 e o complexo G6-G7 em cães do Cazaquistão (STEFANIC et al., 2004; TRACHSEL et al., 2007); G1 e o complexo G6-G7 em cães da Espanha (TRACHSEL et al., 2007); G1, G4 e o complexo G6-G7 em cães do Quirguistão (ZIADINOV et al., 2008); complexo G6-G7 em cães da Lituânia (BRUZINSKAITE et al., 2009); G10 em cães do Canadá (HIMSWORTH et al., 2010a); e o G1 em cães do Kosovo (SHERIFI et al., 2011). No Sul do Brasil, um único estudo havia caracterizado amostras de *Echinococcus* sp. provenientes de cães domésticos, encontrando os genótipos G1, G3 e G5 de *E. granulosus* s.l., porém, identificação realizada em exemplares de vermes adultos obtidos por meio da purgação (de LA RUE et al., 2011).

A falta de informações fidedignas quanto ao sexo e a idade dos cães domésticos não permitiram a realização de inferências sobre a relação com as infecções, porém, no caso da equinococose canina, a infecção parece não estar relacionada com o sexo dos animais (SALEM et al., 2011) e poucos estudos conseguiram estabelecer uma correlação positiva para cargas parasitárias mais altas em cães jovens da Líbia (BUISHI et al., 2005), do Quênia (BUISHI et al., 2006) e da Uganda (INANGOLET et al., 2010). Entretanto, o contrário também foi relatado em uma pesquisa de campo realizada com cães vadios urbanos da Maurîtânia onde os autores estabeleceram uma correlação positiva de entre carga parasitária alta e cães mais velhos (SALEM et al., 2011).

CONCLUSÕES

- a) O diagnóstico molecular pela PCR acompanhada do sequenciamento automático são métodos adequados para a identificação de espécies de *Echinococcus* sp.;
- b) Do ponto de vista epidemiológico, os dados do presente trabalho merecem os seguintes destaques: 1. contemplam o primeiro estudo de campo realizado na região norte do Brasil para avaliar a ocorrência de *Echinococcus* sp. em cães domésticos; 2. confirma o cão doméstico atuando como hospedeiro definitivo de *E. vogeli* em ambiente peridomiciliar na região da Floresta Estadual do Antimary – Sena Madureira; 3. uma vez que as vísceras de pacas fazem parte da dieta regular dos cães domésticos, sinalizam que os cães e seus proprietários, até mesmo nos locais onde *Echinococcus* sp. não foi detectado, estão sob o risco de desenvolverem equinococose ou podem estar com a infecção subdiagnosticada; 4. demonstram a primeira evidência da detecção de *E. granulosus* s.s. em amostra de fezes de hospedeiro definitivo fora da região Sul do Brasil e sobretudo na Região Norte, área endêmica do *E. vogeli* e da equinococose policística;
- c) Os resultados desse estudo apontam para a necessidade de formulação de ações de vigilância para as equinococoses, considerando o cenário da circulação de ambos os agentes etiológicos no Acre.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, I.; BRANZBURG, A.; CAMPOS-PONCE, M.; ABDEL HAFEZ S. K.; RAOUL, F.; CRAIG, P. S.; HAMBURGER, J. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 69, p. 324–330, 2003.
- ABU-MADI, M. A.; BEHNKE, J. M.; PRABHAKER, K. S.; AL-IBRAHIM, R.; LEWIS, J. W. Intestinal helminths of feral cat populations from urban and suburban districts of Qatar. **Veterinary Parasitology**, Vol. 168, p. 284–292, 2010.
- AL-JAWABREH, A.; DUMAIDI, K.; EREQAT, S.; NASEREDDIN, A. AL-JAWABREH, H.; AZMI, K.; AL-LAHAM, N.; ABDEEN, Z. Incidence of *Echinococcus granulosus* in Domestic Dogs in Palestine as Revealed by Copro-PCR. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Vol. 9, n. 7, 2015.
- ALLAN, J. C.; CRAIG, P. S.; GARCIA NOVAL, J.; MENCOS, F.; LIU, D.; WANG, Y.; WEN, H.; ZHOU, P.; STRINGER, R.; ROGAN, M.; ZEYHLE, E. Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. **Parasitology**, Vol. 104, p. 347–356, 1992.
- ALMEIDA, F. **Hidatidose policística no norte do Brasil: abordagem parasitológica e histopatológica de pacas e casos humanos**. 2012. 135f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- ALMEIDA, F.; CALDAS, R.; CORRÊA, C.; RODRIGUES-SILVA, R.; SIQUEIRA, N.; MACHADO-SILVA, J. R.. Co-infections of the cestode *Echinococcus vogeli* and the nematode *Calodium hepaticum* in the hystricomorphic rodent *Agouti paca* from a forest reserve in Acre, Brazil. **Journal of Helminthology**. Vol. 87, n. 4, p. 489-493, 2013.
- ALMEIDA, F.; OLIVEIRA, F.; NEVES, R.; SIQUEIRA, N.; RODRIGUES-SILVA, R.; DAIPERT-GARCIA, D.; MACHADO-SILVA, J. R. Morphometric characteristics of the metacestode *Echinococcus vogeli* Rausch & Bernstein, 1972 in human infections from the northern region of Brazil. **Journal of Helminthology**, Vol. 89, p. 480-486, 2015.
- ANANDA, K. J.; D' SOUZA, P. E. Immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by counter immunoelectrophoresis (CIEP). **Journal of Parasitic Diseases**, Vol. 39, p. 654-657, 2015.
- ANTOLOVA, D.; REITEROVA, K.; MITERPAKOVA, M.; DINKEL, A.; DUBINSKY, P. The first finding of *Echinococcus multilocularis* in dogs in Slovakia: na emerging risk for spreading of infection. **Zoonoses and Public Health**, Vol. 56, p. 53–58, 2009.
- AQUINO, M. L. R. S.; de LIMA, E. R. V.; GAMA E SILVA, Z. A. G. P. Manejo madeireiro na floresta estadual do Antimary, estado do Acre, Brasil. **Revista Nera**, n. 19, p. 104-135, 2011.

- BASSET, D.; GIROU, C.; NOZAIS, I. P.; D'HERMIES, F.; HOANG, C.; GORDON, R.; D'ALESSANDRO, A. Neotropical echinococcosis in Suriname: *Echinococcus oligarthrus* in the orbit and *Echinococcus vogeli* in the abdomen. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 59, p. 787–790, 1998.
- BARNES, T. S.; DEPLAZES, P.; GOTTSSTEIN, B.; JENKINS, D. J.; MATHIS, A.; SILES-LUCAS, M.; TOR-GERSON, P. R.; ZIADINOV, I.; HEATH, D. D. Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. **Acta Tropica**, Vol. 123, p. 1–7, 2012.
- BART, J. M.; ABDUKADER, M.; ZHANG, Y. L.; LIN, R. Y.; WANG, Y. .; NAKAO, M.; ITO, A.; CRAIG, P. S.; PIARROUX, R.; VUITTON, D. A.; WEN, H. Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China. **Parasitology**, Vol. 133, n. 5, p. 571-9, 2006.
- BATISTA, F. A.; PIZZIGATTI, D.; MARTINS, C. F.; NUNES, M. M.; MEGDA, T. T.; RIBEIRO, O. C.; PAIVA, F. **Revista Brasileira de Parasitologia veterinária**, Vol. 19, p. 265-267, 2010.
- BEIROMVAND, M.; AKHLAGHI, L.; FATTAHI MASSOM, S. H.; MOBEDI, I.; MEAMAR, A. R.; OORMAZDI, H.; MOTEVALIAN, A.; RAZMJOU, E. Detection of *Echinococcus multilocularis* in carnivores in Razavi Khorasan province, Iran using mitochondrial DNA. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Vol. 5, e1379, 2011.
- BENITO, A.; CARMENA, D. Double-antibody sandwich ELISA using biotinylated antibodies for the detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in dogs. **Acta Tropica**, Vol. 95, p. 9-15, 2005.
- BENITO, A.; CARMENA, D.; JOSEPH, L.; MARTINEZ, J.; GUI SANTES, J. A. Dog echinococcosis in northern Spain: comparison of coproantigen and serum antibody assays with coprological exam. **Veterinary Parasitology**, Vol. 142, p. 102–111, 2006.
- BENNER, C.; CARABIN, H.; SANCHEZ-SERRANO, L. P.; BUDKE, C. M.; CARMENA, D. Analysis of the economic impact of cystic echinococcosis in Spain. **Bulletin of the World Health Organization**, Vol. 88, p. 49–57, 2010.
- BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, Vol. 37, p. 1021-1026, 2007.
- BERZINS, M. A. V. S. **Velhos, cães e gatos: interpretação de uma relação**. 2000. 132f. Dissertação (Mestrado em Gerontologia) - Curso de Pós-graduação em Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BHAGAT, S. Animal Diversity Web: *Canis lupus familiaris* (dog). 2002. Disponível em: <http://animaldiversity.org/site/accounts/information/Canis_lupus_familiaris.html>. Acesso em: 08/11/2015.
- BLAZIUS, R. D.; EMERICK, S.; PROPHIRO, J. S.; ROMÃO, P. R.; SILVA, O. S. Occurrence of protozoa and helminthes in faecal samples of stray dogs from Itapema City, Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 38, p. 73-74, 2005.

BOTELHO, A. L. M. **Caça de subsistência e os mamíferos da Resex do Alto Tarauacá, Acre**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2013.

BOUFANA, B.; QIU, J.; CHEN, X.; BUDKE, C.; CAMPOS-PONCE, M.; CRAIG, P. S. First report of *Echinococcus shiquicus* in dogs from Eastern Qinghai-Tibet plateau region, China. **Acta Tropica**, Vol. 127, p. 21–24, 2013.

BOWLES, J.; BLAIR D., MCMANUS, D. P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial Sequencing. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Vol. 54, p. 165–173, 1992.

BRENER, B.; MATTOS, D. P. B. G. D.; MILLAR, P. R.; ARASHIRO, E. K. N.; DUQUE-FERREIRA, V.; SUDRÉ, A. P. Estudo da contaminação de praças públicas de três municípios do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, por ovos e larvas de helmintos. **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 37, p. 247-254, 2008.

BRETAGNE, S., GUILLOU, J. P.; MORAND, M.; HOUIN, R. Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. **Parasitology**, Vol. 106, p. 193-199, 1993.

BRICKNER I. The impact of domestic dogs (*Canis familiaris*) on wildlife welfare and conservation: a literature review. With a situation summary from Israel. MStthesis, Tel Aviv University. 2002. Disponível em: <<http://www.tau.ac.il/lifesci/zoology/members/yomtov/inbal/dogs.pdf>>. Acesso em: 03/11/2015.

BRUZINSKAITE, R.; SARKŪNAS, M.; TORGERSON, P. R.; MATHIS, A.; DEPLAZES, P. Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. **Veterinary Parasitology**, Vol. 160, n. 3-4, p. 237-41, 2009.

BUDKE, C. M.; DEPLAZES, P.; TORGERSON, P. R.. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 12, p. 296–303, 2006.

BUIISHI, I.; NJOROGÉ, E.; BOUAMRA, O.; CRAIG, P.S. Canine echinococcosis in northwest Libya: assessment of coproantigen ELISA, and a survey of infection with analysis of risk-factors. **Veterinary Parasitology**, Vol. 130, p. 223–232, 2005.

BUIISHI, I.; NJOROGÉ, E.; ZEYHLE, ROGAN, M.T.; CRAIG, P.S. Canine echinococcosis in Turkana (north-western Kenya): a coproantigen survey in the previous hydatid-control area and an analysis of risk factors. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Vol. 100, p. 601–610, 2006.

CABRERA, A.; YEPES, J.; WIEDNER, C. C. **Mamíferos sudamericanos**: Historia Natural Ediar. Buenos Aires, Argentina: Compania Argentina de Editores, 1960, 377 p.

CABRERA, M.; CANOVA, S.; ROSENVZVIT, M.; GUARNERA, E. Identification of *Echinococcus granulosus* eggs. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Vol. 44, p. 29–34, 2002.

CAMPOS FILHO, P. C.; BARROS, L. M.; CAMPOS, J. O.; BRAGA, V. B.; CAZORLA, I. M.; ALBUQUERQUE, G. R.; CARVALHO, S. M. Zoonotic parasites in dog feces at public squares in the municipality of Itabuna, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Vol. 17, p. 206-209, 2008.

CANTÓ, G. J.; GARCÍA, M. P.; GARCÍA, A.; GUERRERO, M. J.; MOSQUEDA, J. The prevalence and abundance of helminth parasites in stray dogs from the city of Queretaro in central Mexico. **Journal of Helminthology**, Vol. 85, p. 263-269, 2011.

CARMENA, D; CARDONA, G. A. Canine echinococcosis: Global epidemiology and genotypic diversity. **Acta Tropica**, Vol. 128, p. 441– 460, 2013.

CASSENOTE, A. J. F.; PINTO NETO, J. M.; LIMA-CATELANI, A. R. A.; FERREIRA, A. W. Contaminação do solo por ovos de geo-helminthos com potencial zoonótico na municipalidade de Fernandópolis, Estado de São Paulo, entre 2007 e 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 44, p. 371-374, 2011.

CENAMO, M. C.; CARRERO, G. C.; SOARES, P. G. Redução de Emissões do Desmatamento e Degradação Florestal (REDD+): Estudo de Oportunidades para o Sul do Amazonas. 2011. Disponível em: < http://idesam.org.br/publicacao/REDD_Estudo_de_Oportunidades_Sul_Amazonas.pdf> Acesso em: 18/01/2016.

CHAÂBANE-BANAOUES, R.; OUDNI-M'RAD, M.; CABARET, J.; M'RAD, S.; MEZHOUD, H.; BABBA, H. Infection of dogs with *Echinococcus granulosus*: causes and consequences in an hyperendemic area. **Parasites & Vectors**, Vol. 8, p. 231-239, 2015.

CHIKWETO, A.; BHAIYAT, M. I.; TIWARI, K. P.; DE ALLIE, C.; SHARMA, R. N. Spirocerosis in owned and stray dogs in Grenada. **Veterinary Parasitology**, Vol. 190, p. 613-616, 2012.

CHOMEL, B. B.; SUN, B. Zoonoses in the bedroom. **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 17, p. 167–172, 2011.

CORONATO, B.; BASTOS, O. M.; DUARTE, R.; DUARTE, A. N.; LAURENTINO-SILVA, V.; DE SOUZA, M. B.; UCHÔA, C. M. Parasites in stool samples in the environment of Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brazil: an approach in public health. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol. 54, p. 65-67, 2012.

CRAIG, P. S.; GASSER, R. B.; PARADA, L. *et al.* - Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, Vol. 56, p. 293-301, 1995.

CRAIG, P.; MASTIN, A.; VAN KESTEREN, F.; BOUFANA, B. *Echinococcus granulosus*: Epidemiology and state-of-the-art of diagnostics in animals. **Veterinary Parasitology**, Vol. 213, p. 132-148, 2015.

CRAIG, P.; PAWLOWSKI, Z. Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis: an emergent and global problem. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Vol. 8, p. 1362, 2002.

- CUCHER, M. A.; MACCHIAROLI, N.; BALDI, G.; CAMICIA, F.; PRADA, L.; MALDONADO, L.; AVILA, H. G.; FOX, A.; GUTIÉRREZ, A.; NEGRO, P.; LÓPEZ, R.; JENSEN, O.; ROSENZVIT, M.; KAMENETZKY, L. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus* sensu lato in humans and natural domestic hosts. **Tropical Medicine & International Health**, doi: 10.1111/tmi.12647, 2015.
- CURY, M. C.; LIMA, W. S. Helminhos de cães e gatos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Vol. 39, p. 12-35, 2002.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. When is an "asymptomatic" dog asymptomatic? **Veterinary Parasitology**, Vol. 202, p. 341-342, 2014.
- D'ALESSANDRO, A. Polycystic echinococcosis in tropical America: *Echinococcus vogeli* and *E. oligarthrus*. **Acta Tropica**, Vol. 67, p. 43-65, 1997.
- D'ALESSANDRO, A.; RAMIREZ, L. E.; CHAPADEIRO, E.; LOPES, E. R.; DE MESQUITA, P. M. Second recorded case of human infection by *Echinococcus oligarthrus*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 52, p. 29-33, 1995.
- D'ALESSANDRO, A.; RAUSCH, R. L. New Aspects of Neotropical Polycystic (*E. vogeli*) and Unicystic (*E. oligarthrus*). **Clinical Microbiology Reviews**, Vol. 21, p. 380-40, 2008.
- D'ALESSANDRO, A.; RAUSCH, R. L.; CUELLO, C. A. N. *Echinococcus vogeli* in man, with a review of polycystic hydatid disease in Colombia and neighboring countries. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 28, p. 303-317, 1979.
- D'ALESSANDRO, A.; RAUSCH, R. L.; MORALES, G. A.; COLLET, S.; ANGEL, D. *Echinococcus* infections in Colombian animals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 30, p. 1263-1276, 1981.
- DEBOURGOGNE, A.; BLANCHET, D.; FIOR, A.; UMHANG, G.; SIMON, S.; AZNAR, C. Neotropical echinococcosis caused by *Echinococcus vogeli* in a 6-year-old child: the second case report in humans in French Guiana. **Paediatrics and International Child Health**, 2015.
- de LA RUE, M. L.; TAKANO, K.; BROCHADO, J. F.; COSTA, C. V.; SOARES, A. G.; YAMANO, K.; YAGI, K.; KATO, Y.; TAKAHASHI, K. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Vol. 177, p. 97-103, 2011.
- DEMATTEO, K., MICHALSKI, F.; LEITE-PITMAN, M. R. P. *Speothos venaticus*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2011. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/20468/0>>. Acesso em: 20/01/2016.
- DEPLAZES, P.; ALTHERR, P.; TANNER, I.; THOMPSON, R. C. A.; ECKERT, J. *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog, and cat populations. **Journal of Parasitology**, Vol. 85, p. 115-121, 1999.
- DEPLAZES, P.; ECKERT, J. Diagnosis of the *Echinococcus multilocularis* infection in final hosts. **Applied Parasitology**, Vol. 37, p. 245-252, 1996.

DEPLAZES, P.; GOTTSTEIN, B.; ECKERT, J.; JENKINS, D. J.; EWALD, D.; JIMENEZ-PALACIOS S. Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. **Parasitology Research**, Vol. 78, p. 303-308, 1992.

DEPLAZES, P.; JIMENEZ-PALACIOS, S.; GOTTSTEIN, B.; SKAGGS, J.; ECKERT, J. Detection of *Echinococcus* coproantigens in stray dogs of northern Spain. **Applied Parasitology**. Vol. 35, p. 297–301, 1994.

DEPLAZES, P.; VAN KNAPEN, F.; SCHWEIGER, A.; OVERGAAUW, P. A. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. **Veterinary Parasitology**, Vol. 182, p. 41–53, 2011.

DEUTSCH, L. A. An encounter between bush dog (*Speothos venaticus*) and paca (*Agouti paca*). **Journal of Mammalogy**. Vol. 64, p. 532–533, 1983.

DIAZ, N. M.; MENDEZ, G. S.; GRIJALVA, C. J.; WALDEN, H. S.; CRUZ, M.; ARAGON, E.; HERNANDEZ, J. A. Dog over population and burden of exposure to canine distemper virus and other pathogens on Santa Cruz Island, Galapagos. **Preventive Veterinary Medicine**, Vol. 123, p. 128-137, 2015.

DINKEL, A.; VON NICKISCH-ROSENEGK, M.; BILGER, B.; MERLI, M.; LUCIUS, R.; ROMIG, T. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 36, p. 1871-1876, 1998.

DOS SANTOS, H. A.; BARÇANTE, J. M. P.; RIBEIRO, V. M.; DIAS, S. R. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; BARÇANTE, T. A.; LIMA, W. S. Frequência de parasitos intestinais em cães filhotes do município de Belo Horizonte – Minas Gerais. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2002, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002.

DUSCHER, G.; PROSL, H.; JOACHIM, A. Scraping or shaking—a comparison of methods for the quantitative determination of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. **Parasitology Research**, Vol. 95, p. 40–42, 2005.

DYACHENKO, V.; PANTCHEV, N.; GAWLOWSKA, S.; VRHOVEC, M. G.; BAUER, C. *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. **Veterinary Parasitology**, Vol. 157 p. 244–253, 2008.

ECKERT, J. Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. **Acta Tropica**, Vol. 85, 157–163, 2003.

ECKERT, J.; DEPLAZES, P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern, **Clinical Microbiology Reviews**, Vol. 17, p. 107-135, 2004.

ECKERT, J.; DEPLAZES, P.; CRAIG, P. S.; GEMMELL, M. A.; GOTTSTEIN, B.; HEATH, D.; JENKINS, D. J.; KAMIYA, M.; LIGHTOWLERS, M. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: ECKERT, J.; GEMMEL, M.; MESLIN, F.-X.; PAWLOWSKI, Z. S. **WHO/OIE manual of echinococcosis in humans and animals:**

a public health problem of global concern. Paris: World Health Organization / World Organization for Animal Health, 2001a, cap. 3, p. 100-142.

ECKERT, J; GOTTSTEIN, B.; HEATH, D.; LIU, F-J. Prevention of echinococcosis in humans and safety precautions. In: _____. **WHO/OIE manual of echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern.** Paris: World Health Organization / World Organization for Animal Health, 2001b, cap. 7, p. 100-142.

ECKERT, J.; GEMMELL, M.; MATYAS, Z.; SOULSBY, E. J. L. Parasitological diagnosis of adult tapeworms in carnivores. In: _____. **Guidelines for surveillance, prevention and control of echinococcosis/hydatidosis.** Geneva: World Health Organization, 1984, cap. 3, p. 70-80.

ELMORE, S. A.; LALONDE, L. F.; SAMELIUS, G.; ALISAUSKAS, R. T.; GAJADHAR, A. A.; JENKINS, E. J. Endoparasites in the feces of arctic foxes in a terrestrial ecosystem in Canada. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife** 2, p. 90–96, 2013.

FARIAS, L. N; MALGOR, R.; CASSARAVILLA, C.; BRAGANÇA, C.; de LA RUE, M. L. Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol. 46, p.153-156, 2004.

FIGUEIREDO, M. I. D. O.; WENDT, E. W.; SANTOS, H. T. D.; MOREIRA, C. M. Levantamento sazonal de parasitos em caixas de areia nas escolas municipais de educação infantil em Uruguaiana, RS, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 41, p. 36-46, 2012.

FONSECA, E. J.; DO AMARANTE, E. E.; DE S ABBOUD, L. C.; HEES, S. J., FRANCO, R. J.; DE A SILVA, B. J. Fatal esophageal fibrosarcoma associated to parasitism by spirurid nematode *Spirocerca lupi* in a dog: a case report. **Journal of Parasitic Diseases**, Vol. 36, p. 273-276, 2012.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária.** Porto Alegre: Editora Sulina, 1987, p. 292-294.

FREITAS, M. G. **Helmintologia Veterinária.** Belo Horizonte: Copiadora e Editora Rabelo & Brasil Ltda, 1977, 396 p.

GASSER, R. B.; JENKINS D. J.; HEATH, D. D.; LAWRENCE, S. B. Use of *Echinococcus granulosus* worm antigens for immunodiagnosis of *E. granulosus* infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, Vol. 45, p. 89-100, 1992.

GASSER, R. B.; LIGHTOWLERS, M. W.; OBENDORF, D. L.; JENKINS, D. J.; RICKARD, M. D. Evaluation of a serological test system for the diagnosis of natural *Echinococcus granulosus* infection in dogs using *E. granulosus* protoscolex and oncosphere antigens. **Australian Veterinary Journal**, Vol. 65, p. 369-73, 1988.

GASSER R. B.; PARADA, L.; ACUNA, A.; BURGESS, C.; LAURENSEN, M. K.; GULLAND, F. M.; REICHEL, M. P.; PAOLILLO, E. Immunological assessment of exposure to *Echinococcus granulosus* in a rural dog population in Uruguay. **Acta Tropica**, Vol. 58, p. 179-85, 1994.

GEMMELL, M. A. Safe handling of infected definitive hosts and eggs of *Echinococcus* spp. **Bulletin of the World Health Organization Supplement**, Vol. 39, p. 122-125, 1968.

GEMMELL, M. A.; LAWSON, A. J. R. Epidemiology and control of hydatid disease. In: THOMPSON, R. C. A. (Ed.). **The biology of *Echinococcus* and hydatid disease**. London: George Allen & Unwin, 1986, p. 189-216.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J., CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. Vol. 36, p. 87-91, 1999.

GEORGI, J. R. Tapeworms. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Vol. 17, p. 1285-1306, 1987.

GHOLAMI, I.; DARYANI, A.; SHARIF, M.; AMOUEI, A.; MOBEDI, I. Seroepidemiological survey of helminthic parasites of stray dogs in Sari City, northern Iran. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. Vol. 14, p. 133-137, 2011.

GIANNELLI, A.; BALDASSARRE, V.; RAMOS, R. A.; LIA, R. P.; FURLANELLO, T.; TROTTA, M.; DANTAS-TORRES, F.; BANETH, G.; OTRANTO, D. *Spirocerca lupi* infection in a dog from southern Italy: an "old fashioned" disease? **Parasitology Research**, Vol. 113, p. 2391-2394, 2014.

GONZÁLEZ F. C. G.; GALILEA, O. N. M.; PIZARRO, C. K. Autochthonous cutaneous larva migrans in Chile. A case report. **Revista Chilena Pediatría**, Vol. 86, p. 426-429, 2015.

GONZALEZ, L. M.; MONTERO, E.; HARRISON, L. J.; PARKHOUSE, R. M.; GARATE, T. 2000. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 38, p. 737-744, 2000.

GROSSO, G.; GRUTTADAURIA, S.; BIONDI, A.; MARVENTANO, S.; MISTRETTA, A. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. **World Journal of Gastroenterology**, Vol. 18, p. 1425-1437, 2012.

HAJIBABAEI, M.; SINGER G. A.; CLARE, E. L.; HEBERT, P. D. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. **BioMed Central Biology**, Vol 5, p. 24-, 2007.

HAMBURGER, J.; HE-NA, ABBASI I, RAMZY RM, JOURDANE J, RUPPEL A, 2001. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 65, p. 907-911, 2001.

HAMBURGER, J.; TURETSKI, T.; KAPPELLER, I.; DERESIEVICZ, R. Highly repeated DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Vol. 44, p. 73-80, 1991.

HAMBURGER, J.; XU, Y. X.; RAMZI, R. M.; JOURDANE, J.; RUPPEL, A. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni*

infestation of water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 59. p. 468–473, 1998.

HARE, B.; BROWN, M.; WILLIAMSON, C.; TOMASELLO, M. The domestication of social cognition in dogs. *Science*. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/298/5598/1634>>. Acesso em: 03/11/2015.

HIMSWORTH, C. G.; JENKINS, E.; HILL, J. E.; NSUNGU, M.; NDAO, M.; ANDREW THOMPSON, R. C.; COVACIN, C.; ASH, A.; WAGNER, B. A.; MCCONNELL, A.; LEIGHTON, F. A.; SKINNER S. Emergence of sylvatic *Echinococcus granulosus* as a parasitic zoonosis of public health concern in an indigenous community in Canada. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 82 p. 643–645, 2010a.

HIMSWORTH, C. G.; SKINNER, S.; CHABAN, B.; JENKINS, E.; WAGNER, B. A.; HARMS, N. J.; LEIGHTON, F. A.; THOMPSON, R. C.; HILL, J. E. Multiple zoonotic pathogens identified in canine feces collected from a remote Canadian indigenous community. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 83, p. 338–341, 2010b.

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

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L., Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, Vol. 9, p. 283-289, 1934.

HOWARD, E. B.; GENDRON, A. P. *Echinococcus vogeli* infection in higher primates at the Los Angeles Zoo. In: MONTALI, R. J.; MIGAKI, G. (Eds.). **The comparative pathology of zoo animals**: Symposia of the National Zoological Park. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1980. p. 379–382.

HUSSON, A. M. **The mammals of Suriname**. Leiden, The Netherlands: E.J. Brill, 1978. 729p.

INANGOLET, F.O.; BIFFA, D.; OPUDA-ASIBO, J.; OLOYA, J.; SKJERVE, E. Distribution and intensity of *Echinococcus granulosus* infections in dogs in Moroto District, Uganda. **Tropical Animal Health and Production**, Vol. 42, p. 1451–1457, 2010.

ING, M. B.; SCHANTZ, P. M.; TURNER, J. A. Human coenurosis in North America: case reports and review. **Clinical Infectious Diseases**, Vol. 27, p.519-523, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estados@**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ac>>. Acesso em: 18/01/2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa do Acre**. Disponível em: < <http://www.guiageo.com/acre.htm>>. Acesso em: 20/01/2016.

ITO, M.; ITAGAKI, T. Survey on wild rodents for endoparasites in Iwate Prefecture. Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. Vol. 65, p. 1151-1153, 2003.

JENKINS, D. J.; CRAIG, N. A. The role of foxes *Vulpes vulpes* in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in urban environments. **Medical Journal of Australia**, Vol. 157, p. 754-756, 1992.

JENKINS, D. J.; FRASER, A.; BRADSHAW, H.; CRAIG, P. S. Detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in Australian canids with natural or experimental infection. **Journal Parasitology**, Vol. 86, p. 140-145, 2000.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, Vol. 74, p.175-184. 2007.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. **Zoonoses Public Health**, Vol. 55, p. 406-13, 2008.

KENDALL, P. Stone age man kept a dog. **Nature**. 2002. Disponível em: <http://www.nature.com/nsu/021118/021118-12.html>>. Acesso em: 03/11/2015.

LANGGUTH, A. Ecology and evolution in the south american canids. In: FOX, W. M. (Ed.). **The wild canids: Their systematics, behavioral ecology and evolution**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1975.

LARRIEU, E., ZANINI, F. Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974–2010. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Vol. 31, p. 81–87, 2012.

LASS, A.; SZOSTAKOWSKA, B.; MYJAK, P.; KORZENIEWSKI, K. The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR. **Parasitology Research**, Vol. 114, p. 4023-4029, 2015.

LAURIMAA, L.; DAVISON, J.; SÜLD, K.; PLUMER, L.; OJA, R.; MOKS, E.; KEIS, M.; HINDRIKSON, M.; KINKAR, L.; LAURIMÄE, T.; ABNER, J.; REMM, J.; ANIJALG, P.; SAARMA, U. First report of highly pathogenic *Echinococcus granulosus* genotype G1 in dogs in a European urban environment. **Parasites & Vectors**, Vol. 8, p. 182-186, 2015.

LAWS, G. F. Physical factors influencing survival of taeniid eggs. **Experimental Parasitology**, Vol. 22, p. 227-239, 1968.

LAWSON, J. R.; GEMMELL, M. A. Hydatidosis and cysticercosis: the dynamics of transmission. **Advances in Parasitology**, Vol. 22, p. 262-308, 1983.

LEFKADITIS, M. A.; PASTIU, A. I.; RODI-BURIEL, A.; SOSSIDOU, A. V.; PANORIAS, A. H.; ELEFThERIADIS, T. G. et al. Helminth burden in stray cats from Thessaloniki, Greece. **Helminthologia**, Vol. 51, p. 73–76, 2014.

LIMA, V. F.; CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; MONTEIRO, M. F.; CALADO, A. M.; RAMOS, R. A.; MEIRA-SANTOS, P. O.; ALVES, L. C. A comparison of mini-FLOTAC and FLOTAC with classic methods to diagnosing intestinal parasites of dogs from Brazil. **Parasitology Research**, Vol. 114, p. 3529-3533, 2015.

- LIU F. -J. Prevalence of *Echinococcus granulosus* in dogs in the Xinjiang Uygur Autonomous Region PRC. In: ANDERSEN, F. L.; CHAI, J. -J; LIU, F. -J. (Eds.). **Compendium on cystic echinococcosis with special reference to the Xinjiang Uygur Autonomous Region, the People's Republic of China**. Provo, Utah: Brigham Young University Press, 1993, p.168-176.
- LLOYD, S. Toxocarosis. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D. I. H. **Zoonoses Biology, Clinical Practice, and Public Health Control**. Oxford University Press, 1998, p. 841-854.
- LOPERA, R. D.; MELÉNDEZ, R. D.; FERNANDEZ, I.; SIRIT, J.; PERERA, M. P. Orbital Hydatid Cyst of *Echinococcus oligarthrus* in a Human in Venezuela. **The Journal of Parasitology**, Vol. 75, p. 467-470, 1989.
- LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 11, p. 121-155, 1919.
- MA, J.; WANG, H.; LIN, G.; CRAIG, P. S.; ITO, A.; CAI, Z.; ZHANG, T.; HAN, X.; MA, X.; ZHANG, J.; LIU, Y.; ZHAO, Y.; WANG, Y. Molecular identification of *Echinococcus* species from eastern and southern Qinghai, China, based on the mitochondrial *cox1* gene. **Parasitology Research**, Vol. 111, p. 179–184, 2012
- MAAS, M.; DAM-DEISZ, W. D.; VAN ROON, A. M.; TAKUMI, K.; VAN DER GIESSEN, J. W. Significant increase of *Echinococcus multilocularis* prevalence in foxes, but no increased predicted risk for humans. **Veterinary Parasitology**, Vol. 206, p. 167-172, 2014.
- MACPHERSON, C. N. L.; ZEYHLE, E.; ROMIG, T. An *Echinococcus* pilot control programme for north-west Turkana, Kenya. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Vol. 78, p. 188-192, 1984.
- MATEUS, T. L.; CASTRO, A.; RIBEIRO, J. N.; VIEIRA-PINTO, M. Multiple Zoonotic Parasites Identified in Dog Feces Collected in Ponte de Lima, Portugal - A Potential Threat to Human Health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Vol. 11, p. 9050 – 9067, 2014.
- MATHIS, A., DEPLAZES, P.; ECKERT, J. Improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. **Journal of Helminthology**, Vol. 70, p. 219-222, 1996.
- MATOFF K.; KOLEV G. The role of Hairs, Muzzle and Paws of Echinococci dogs in the epidemiology of echinococcosis. **Tropenmed Parasitol**, Vol. 15, p. 452-460, 1964.
- MARQUES, J. P.; GUIMARÃES, C. R.; BOAS, A. V.; CARNAÚBA, P. U.; MORAES, J. D. Contamination of public parks and squares from Guarulhos (São Paulo State, Brazil) by *Toxocara* spp. and *Ancylostoma* spp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol. 54, p. 267-271, 2012.

MAYOR, P.; BAQUEDANO, L. E.; SANCHEZ, E.; ARAMBURU, J.; GOMEZ-PUERTA, L. A.; MAMANI, V. J.; GAVIDIA, C. M. Polycystic echinococcosis in Pacas, Amazon region, Peru. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Vol. 21, p. 456-459, 2015.

MCCARTHY, J.; MOORE, T. A. Emerging helminth zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Vol. 30, p.1351-1360, 2000.

MCMANUS, D. P. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 96, s. 151-157, 2002.

MCMANUS, D. P.; BOWLES J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. **International Journal for Parasitology**, Vol. 26, p. 687-704, 1996.

MCMANUS, D. P.; THOMPSON, R. C. A. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. **Parasitology**, 127 (Suppl.), S37–S51, 2003.

MCMANUS, D. P., ZHANG, W., LI, J., BARTLEY, P. B. Echinococcosis. **Lancet**, Vol. 362, p.1295–1304, 2003.

MC REYNOLDS, L. A.; DE SIMONE, S. M.; WILLIAM, S. S. A. Cloning and comparison of repeated DNA sequences from the human filarial parasite *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Vol. 83, p. 797–801, 1986.

MENEGHELLI, U. G.; BARBÓ, M. L. P.; MAGRO, J. E.; BELLUCI, A. D.; VELLUDO, M. A. S. L. Polycystic hydatid disease (*Echinococcus vogeli*): clinical and radiological manifestations and treatment with albendazol of a patient from the Brazilian Amazon region. **Arquivos de Gastroenterologia**, Vol. 23, p. 177-183, 1986.

MENEGHELLI, U. G.; MARTINELLI, A. L. C.; VELLUDO, M. A. S. L. *Echinococcus vogeli* cysts in paca liver (*Cuniculus paca*) native from the Acre State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 23, p. 153-155, 1990.

MENEGHELLI, U. G.; MARTINELLI, A. L. C.; VELLUDO, M. A. S. L.; BELLUCI, A. D.; MAGRO, J. E.; BARBO, M. L. P. Polycystic hydatid disease (*Echinococcus vogeli*) clinical, laboratory and morphological findings in nine Brazilian patients. **Journal of Hepatology**. Vol. 14, p. 203-210, 1992.

MENSE, M. G.; GARDINER C. H.; MOELLER, R. B.; PARTRIDGE, H. L.; WILSON, S. Chronic emesis caused by a nematode induced gastric nodule a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Vol. 15, p. 597-98, 1992.

MOBEDI, I.; ZARE-BIDAKI, M.; SIAVASHI, M. R.; NADDAF, S. R.; KIA, E. B.; MAHMOUDI, M. Differential Detection of *Echinococcus* spp. Copro-DNA by Nested-PCR in Domestic and Wild Definitive Hosts in Moghan Plain, Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, Vol. 8, p. 107-113, 2013.

- MOLINA, C. P.; OGBURN, J.; ADEGBOYEGA, P. Infection by *Dipylidium caninum* in an infant. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Vol. 127, p. 157-159, 2003.
- MONTEIRO, D. U.; BOTTON, S. de A.; TONIN, A. A.; HAAG, K. L.; MUSSKOPF, G.; AZEVEDO, M. I.; WEIBLEN, C.; RIBEIRO, T. C.; de LA RUE, M. L. *Echinococcus granulosus* sensu lato and *Taenia hydatigena* in pig in southern Brazil, Vol. 24, p. 227-229, 2015.
- MORO, P. L.; BONIFACIO, N.; GILMAN, R. H.; LOPERA, L.; SILVA, B.; TAKU- MOTO, R.; VERASTEGUI, M.; CABRERA, L. Field diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection among intermediate and definitive hosts in an endemic focus of human cystic echinococcosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 93, p. 611–615, 1999.
- MORO, P. L.; SCHANTZ, P. M. Echinococcosis: a review. **International Journal of Infection Diseases**, Vol. 13, p. 125-133, 2009.
- MOSS, J. E.; CHEN, X.; LI, T.; QIU, J.; WANG, Q.; GIRAUDOUX, P.; ITO, A.; TORGERSON, P. R.; CRAIG, P. S. Reinfection studies of canine echinococcosis and role of dogs in transmission of *Echinococcus multilocularis* in Tibetan communities, Sichuan, China. **Parasitology**, Vol. 140, p. 1685-1692, 2013.
- MOURA, M. Q. D.; JESKE, S.; VIEIRA, J. N.; CORRÊA, T. G.; BERNE, M. E. A.; VILLELA, M. M. Frequency of geohelminths in public squares in Pelotas, RS, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Vol. 22, p. 175-178, 2013.
- NAGY, A.; ZIADINOV, I.; SCHWEIGER, A.; SCHNYDER, M.; DEPLAZES, M. Hair coat contamination with zoonotic helminth eggs of farm and pet dogs and foxes. **Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, Vol. 124, p. 503–511, 2011.
- NAKAO, M.; MCMANUS, D. P.; SCHANTZ, P. M.; CRAIG, P. S.; ITO, A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. **Parasitology**, Vol. 134, p. 713-722, 2007.
- NAMUE, C., WONGSAWAD, C. A survey of helminth infection in rats (*Rattus* spp.) from Chiang Mai Moat. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. Vol. 28, p. 179-183, 1997.
- NGUI, R.; LEE, S. C.; YAP, N. J.; TAN, T. K.; AIDIL, R. M.; CHUA, K. H.; AZIZ, S.; SULAIMAN, W. Y.; AHMAD, A. F.; MAHMUD, R.; LIAN, Y. L. Gastrointestinal parasites in rural dogs and cats in Selangor and Pahang states in Peninsular Malaysia. **Acta Parasitologica**, Vol. 59, n. 4, p. 737–744, 2014.
- NIVY, R.; CALDIN, M.; LAVY, E.; SHAABON, K.; SEGEV, G.; AROCH, I. Serum acute phase protein concentrations in dogs with spirocercosis and their association with esophageal neoplasia - a prospective cohort study. **Veterinary Parasitology**, Vol. 203, p. 153-159, 2014.
- NONAKA, N.; KAMIYA, M.; KOBAYASHI, F.; GANZORIG, S.; ANDO, S.; YAGI, K.; IWAKI, T.; INOUE, T.; OKU, Y. *Echinococcus multilocularis* infection in pet dogs in Japan. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Vol. 9, p. 201–206, 2009.

NOSIK, A. F. Epizootiology and epidemiology of echinococcosis. **Proc. Kharkov Veterinary Institute**, p. 264-270, 1952.

NOYA-ALARCÓN, O.; COLMENARES, C.; LANDER, O.; MONTERO, M.; CANTELE, H.; PETIT, M.; BOTTO, C.; ALARCÓN DE NOYA, B. Hidatidosis poliquística autóctona en dos pacientes Yanomami en el Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, Vol. 51, n. 2, 2011.

OLIVEIRA-ARBEX, A. P.; DAVID, E. B.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C.; KATAGIRI, S.; CORADI, S. T.; GUIMARÃES, S. Molecular identification of *Ancylostoma* species from dogs and an assessment of zoonotic risk in low-income households, São Paulo State, Brazil. **Journal of Helminthology**, p. 1-6, 2016.

OLIVEIRA, A. T. G.; SILVA, A. P. P. S.; FARIAS, C. S.; ALVES, M. S.; SILVEIRA, L. J. D.; FARIAS, J. A. C. Contaminação de ambientes arenosos por helmintos em praças públicas da cidade de Maceió-AL. **Revista Brasileira de Sementes**, Vol. 6, p. 21-29, 2011.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C.; AMARANTE, A. F.; FERRARI, T. B.; NUNES, L. C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Vol. 103, p. 19-27, 2002.

OOSTBURG, B. F. J.; VREDE, M. A.; BERGEN, A. E. The occurrence of polycystic echinococcosis in Suriname. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Vol. 94, p. 247– 252, 2000.

OTERO-ABAD, B.; TORGERSON, P. R. A Systematic Review of the Epidemiology of Echinococcosis in Domestic and Wild Animals. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Vol.7, n. 6, p. 2249, 2013.

OVERGAAUW, P. A. M. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. **Critical Reviews in Microbiology**, Vol. 23, p.233-251, 1997.

OVODOV, N. D.; CROCKFORD, S. J.; KUZMIN, Y. V.; HIGHAM, T. F.; HODGINS, G. W.; VAN DER PLICHT, J. A 33,000-year-old incipient dog from the Altai Mountains of Siberia: evidence of the earliest domestication disrupted by the Last Glacial Maximum. **PLoS ONE**, Vol. 6, 2011.

PAPINI, R.; GIRIVETTO, M.; MARANGI, M.; MANCIANTI, F.; GIANGASPERO, A. Endoparasite infections in pet and zoo birds in Italy. **The Scientific World Journal**. Vol. 2012, ID 253127, 2012.

PARAMASVARAN, S.; SANI, R. A.; HASSAN, L.; HANJEET, K.; KRISHNASAMY, M.; JOHN, J.; SANTANA, R.; SUMARNI, M. G.; LIM, K. H. Endo-parasite fauna of rodents caught in five wet markets in Kuala Lumpur and its potential zoonotic implications. **Tropical Biomedicine**, Vol. 26, p. 67-72, 2009.

PARSA, F.; FASIHI HARANDI, M.; ROSTAMI, S.; SHARBATKHORI, M. Genotyping *Echinococcus granulosus* from dogs from Western Iran. **Experimental Parasitology**, Vol. 132, p. 308–312, 2012.

PARSONS, J. C. Ascarid infections of cats and dogs. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Vol. 17, p.1307-1340, 1987.

PASTORE, R.; VITALI, L. H.; MACEDO, V. O.; PRATA, A. A serological survey of the infection by *Echinococcus* sp. in the municipality of Sena Madureira, Acre. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 36, p. 473-477, 2003a.

PASTORE, R.; VITALI, L. H.; WEIRICH, J.; TOJAL, A. C.; MACEDO, V. O.; PRATA, A. Hidatidosis poliquistica: relato de dois casos procedentes de Sena Madureira, Acre, na Amazônia brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 36, p. 97-101, 2003b.

PATRONEK, G. J.; WATERS D. J.; GLICKMAN, L. T. Comparative longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research. **Journal of Gerontology: Biological Science A**. Vol. 52, p.171-178, 1997.

PAUL, M.; KING, L.; CARLIN, E. P. Zoonoses of people and their pets: a US perspective on significant pet-associated parasitic diseases. **Trends in Parasitology**, Vol. 26,p. 153–154, 2010.

PEDRASSANI, D.; VIERA, A. M.; THIEM, E. M. B. Contaminação por *Toxocara* spp. e *Ancylostoma* spp. em áreas de lazer do município de Canoinhas, SC. **Archives of Veterinary Science**, Vol. 13, p. 110-117, 2008.

PEREIRA, T. M. **Soro-reatividade para hidatidose policística e análise sócio-epidemiológica em Sena Madureira, Acre – Brasil**. 2014. 74f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

PORTAL DO GOVERNO DO ACRE. Acre. Bujari. Disponível em: <<http://www.ac.gov.br/wps/portal/acre/Acre/estado-acre/municipios/bujari>>. Acesso em: 06/05/2015.

PORTAL DO GOVERNO DO ACRE. Acre. O Estado. Disponível em: <<http://www.ac.gov.br/wps/portal/acre/Acre/estado-acre>>. Acesso em: 03/11/2015.

PORTAL DO GOVERNO DO ACRE. Acre. Xapuri. Disponível em: <<http://www.ac.gov.br/wps/portal/acre/Acre/estado-acre/municipios/xapuri>>. Acesso em: 03/11/2015.

PRADO, G.; RIBEIRO, H. Grassification of the Amazon region and meat consumption: what is behind? **Saude e Sociedade**, Vol.20, n. 3, 2011.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. **Parasitology Research**, Vol. 91, p. 412–438, 2003.

RAMÍREZ-BARRIOS, R. A.; BARBOZA-MENA, G.; MUNOZ, J.; ANGULO-CUBILLAN, F.; HERNANDEZ, E.; GONZALEZ, F.; ESCALONA, F. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. **Veterinary Parasitology**, Vol. 121, p.11-20, 2004.

RAMOS, D. G.; SCHEREMETA, R. G.; OLIVEIRA, A. C.; SINKOC, A. L.; PACHECO, R. de C. Survey of helminth parasites of cats from the metropolitan area of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Vol. 22, p. 201-206, 2013.

RANEN, E.; LAVY, E.; AIZENBERG, I.; PERL, S.; HARRUS, S. Spirocercosis-associated esophageal sarcomas in dogs. A retrospective study of 17 cases (1997-2003). **Veterinary Parasitology**, Vol. 30, p. 209-221, 2004.

RAUSCH, R. L. Life cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In: THOMPSON, R. C. A (Ed.). **The biology of Echinococcus and hydatid disease**. London: G.A. Allen & Unwin, London, 1986. p. 44-80.

RAUSCH, R. L. Life cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In: THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. L (Eds.). **Echinococcus and hydatid disease**. Wallingford, Oxon: CAB International, 1995. p. 88-134.

RAUSCH, R. L. *Echinococcus granulosus*: biology and ecology. In: ANDERSEN, F. L.; OUHELLI, H; KACHANI, M. (Eds.). **Compendium on echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special reference to Morocco**. Provo, Utah: Brigham Young University Print Services, 1997. p. 18-53.

RAUSCH, R. L. Cystic echinococcosis in the Arctic and sub-Arctic. **Parasitology**, Vol. 127, p. 73-85, 2003.

RAUSCH, R. L.; D'ALESSANDRO, A. Histogenesis in the metacestode of *Echinococcus vogeli* and mechanism of pathogenesis in polycystic hydatid disease. **Journal of Parasitology**, Vol. 85, p. 410-418, 1999.

RAUSCH, R. L.; D'ALESSANDRO, A. The epidemiology of echinococcosis caused by *Echinococcus oligarthrus* and *E. vogeli* in the Neotropics. In: CRAIG, P.; PAWLOWSKI, Z. (Eds.). **Proceedings of the NATO Workshop on Cestode Zoonoses: echinococcosis and cysticercosis—an emergent and global problem**. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press, 2002, p. 107-113.

RAUSCH, R. L.; D'ALESSANDRO, A.; RAUSCH, V. R. Characteristics of the larval *Echinococcus vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 in the natural intermediate host, the paca, *Cuniculus paca* L. (Rodentia: Dasyproctidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 30, p.1043-1052, 1981.

RAUSCH, R. L.; RAUSCH, V. R.; D'ALESSANDRO, A. Discrimination of the larval stages of *Echinococcus oligarthrus* (Diesing, 1863) and *E. vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 (Cestoda: Taeniidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 27, p. 1195-1202, 1978.

RIBEIRO, V. M. Controle de helmintos de cães e gatos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Vol. 13, p.88-95, 2004.

ROELFSEMA, J. H.; NOZARI, N.; PINELLI, E.; KORTBEEK, L. M. Novel PCRs for differential diagnosis of cestodes. **Experimental Parasitology**, Vol. 161, p. 20-6, 2016.

ROMIG, T.; EBI, D.; WASSERMANN, M. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* sensu lato. **Veterinary Parasitology**, Vol. 213, p.76-84, 2015.

ROSSI, A. Cão cidadão: Como enxergam os cães. 2010. Disponível em: <http://caocidadao.com.br/artigos_caes.php?id=76&categoria=Caes>. Acesso em: 08/11/2015.

RUYZ, A.; SCHANTZ, P.; ARAMBULO III, P. **Proceedings of the Scientific Working Group on the advances in the prevention, control and treatment of hydatidosis**. Montevideo: Pan American Health Organization, 1995.

SAARMA, U.; JÕGISALU, I.; MOKS, E.; VARCASIA, A.; LAVIKAINEN, A.; OKSANEN, A.; SIMSEK, S.; ANDRESIUK, V.; DENEGRI, G.; GONZÁLEZ, L. M.; FERRER, E.; GÁRATE, T.; RINALDI, L.; MARAVILLA, P. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. **Parasitology**, Vol. 136, p. 317-328, 2009.

SAGER, H.; MORET, C. H. S.; GRIMM, F.; DEPLAZES, P.; DOHERR, M. G.; GOTTSTEIN, B. Coprological study on intestinal helminths in Swiss dogs: temporal aspects of anthelmintic treatment. **Parasitology Research**, Vol. 98, p. 333–338, 2006.

SALEM, C. O.; SCHNEEGANS, F.; CHOLLET, J.; JEMLI, M. E. Epidemiological studies on echinococcosis and characterization of human and livestock hydatid cysts in Mauritania, **Iran. Journal of Parasitology**, Vol. 6, p. 49–57, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, Third Edition ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANCHEZ, E.; CACERES, O.; NAQUIRA, C.; GARCIA, D.; PLATINO, G.; SILVIA, H.; VOLOTAO, A. C.; FERNANDES, O. Molecular characterization of *E. granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome CO1 gene. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 105, p. 806–810, 2010.

SANCHEZ-THEVENET, P; JENSEN, O; DRUT, R; CERRONE, G. E.; GRENÓVERO, M. S.; ALVAREZ, H. M.; TARGOVNIK, H. M.; BASUALDO, J. A. Viability and infectiousness of eggs of *Echinococcus granulosus* aged under natural conditions of inferior arid climate. **Veterinary Parasitology**, Vol. 133, p. 71-77, 2005.

SANTILLÁN, G. - Vigilancia de la contaminación ambiental por *Echinococcus* sp. **Archivos Internacionales de la Hidatidosis**, Vol. 33, p. 11-13, 1999.

SANTOS, G. B.; SOARES, M. C. P.; BRITO, E. M. F.; RODRIGUES, A. L.; SIQUEIRA, N. G.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; ALVES, M. M.; CARNEIRO, L. A.; MALHEIROS, A. P.; PÓVOA, M. M.; ZAHA, A.; HAAG, K. L. Mitochondrial and nuclear sequence polymorphisms reveal geographic structuring in Amazonian populations of *Echinococcus vogeli* (Cestoda: Taeniidae). **International Journal for Parasitology**, Vol. 42, p. 1115-1118, 2012.

SASANI, F.; JAVANBAKHT, J.; JAVAHERI, A.; HASSAN, M. A.; BASHIRI, S. The evaluation of retrospective pathological lesions on spirocercosis (*Spirocerca lupi*) in dogs. **Journal of Parasitic Diseases**, Vol. 38, p. 170-173, 2014.

SAVOLAINEN, P.; ZHANG, Y.; LUNDEBERG, J.; LEITNER, T. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/298/5598/1610>>. Acesso em: 03/11/2015.

SCAINI, C. J.; DE TOLEDO, R. N.; LOVATEL, R.; DIONELLO, M. A.; DOS ANJOS GATTI, F.; SUSIN, L.; SIGNORINI, V. R. Environmental contamination by helminth eggs and larvae in dog feces from central area of Cassino beach, Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 36, p. 617-619, 2003.

SCHANTZ, P. M. Sources and uses of surveillance data for cystic echinococcosis. In: ANDERSEN, F. L.; OUHELLI, H.; KACHANI, M. (Eds.). **Compendium on echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special reference to Morocco**. Provo, Utah: Brigham Young University Print Services, 1997, p. 72-84.

SCHANTZ, R. L.; D'ALESSANDRO, A. The epidemiology of echinococcosis caused by *Echinococcus oligarthrus* and *E. vogeli* in the Neotropics. In: CRAIG, P.; PAWLOWSKI, Z. (Eds.). **Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem**. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press, 2002. p. 107-113.

SCIOSCIA, N. P.; BELDOMENICO, P. M.; PETRIGH, R. S.; PIERANGELI, N.; DENEGRI, G. M. Epidemiological studies on *Echinococcus* in Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) and European hare (*Lepus europaeus*) in Buenos Aires province, Argentina. **Parasitology Research**. Vol. 112, p. 3607-3613, 2013.

SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE DO ACRE. Plano estadual de recursos hídricos do Acre. 2012. Disponível em: <http://d3nehc6yl9qzo4.cloudfront.net/downloads/plano_estadual_recursos_hidricos_acre.pdf>. Acesso em: 18/01/2016.

SHARMA, R.; SINGH, B. B.; GILL, J. P. Larva migrans in India: veterinary and public health perspectives. **Journal of Parasitic Diseases**, Vol. 39, p. 604-12, 2015.

SHERIFI, K.; REXHEPI, A.; HAMIDI, A.; BEHLULI, B.; ZESSIN, K. H.; MATHIS, A.; DEPLAZES, P. Detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* (sheep-strain, G1) in naturally infected dogs in Kosovo. **Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, Vol. 124, p. 518-521, 2011.

SHIPOV, A.; KELMER, G.; LAVY, E.; MILGRAM, J.; AROCH, I.; SEGEV, G. Long-term outcome of transendoscopic oesophageal mass ablation in dogs with *Spirocerca lupi*-associated oesophageal sarcoma. **The Veterinary Record**, Vol. 177, p. 365, 2015.

SIAVASHI, M. R.; MOTAMEDI, G. R. Evaluation of a coproantigen enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of canine echinococcosis in Iran. **Helminthologia**, Vol. 43, p. 17-19, 2006.

SIQUEIRA, N. G.; ALMEIDA, F. B.; CHALUB, S. R. S.; MACHADO-SILVA, J. R.; RODRIGUES-SILVA, R. Successful outcome of hepatic polycystic echinococcosis managed

with surgery and chemotherapy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. **101**, p. 624–626, 2007.

SIQUEIRA, N. G.; SIQUEIRA, C. M.; RODRIGUES-SILVA, R.; SOARES, M. DO C.; PÓVOA, M. M. Polycystic echinococcosis in the state of Acre, Brazil: contribution to patient diagnosis, treatment and prognosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 108, n. 5, p. 533–540, 2013.

SOARES, M. DO C.; MOREIRA-SILVA, C. A.; ALVES, M. M.; NUNES, H. M.; AMARAL, I. A.; MOIA, L. J. M. P.; CONDE, S. R. S. S.; ALMEIDA, F. B.; RODRIGUES-SILVA, R.; CRESCENTE, J. A. B. Equinococose policística na Amazônia oriental brasileira: atualização da casuística. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 37, p. 75–83, 2004.

SOARES, M. DO C.; RODRIGUES, A. L.; MOREIRA-SILVA, C. A.; BRITO, E. M.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; CORRÊA, I. R.; PINHO, J. R.; MALHEIROS, A. P.; NUNES, H. M.; PÓVOA, M. M. Anatomical and molecular description of liver neotropical echinococcosis caused by *Echinococcus oligarthrus* in human host. **Acta Tropica**, Vol. 125, p. 110-114, 2013.

SOARES, M. DO C.; SOUZA DE SOUZA, A. J.; PINHEIRO MALHEIROS, A.; NUNES, H. M.; ALMEIDA CARNEIRO, L.; ALVES, M. M.; FARIAS DA CONCEIÇÃO, B.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; MARINS PÓVOA, M. Neotropical echinococcosis: second report of *Echinococcus vogeli* natural infection in its main definitive host, the bush dog (*Speothos venaticus*). **Parasitology International**, Vol. 63, p. 485-487, 2014.

SORIANO, S. V.; PIERANGELI, N. B.; PIANCIOLA, L.; MAZZEO, M.; LAZZARINI, L. E.; SAIZ, M. S.; KOSSMAN, A. V.; BERGAGNA, H. F.; CHARTIER, K.; BASUALDO, J. A. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquen, Patagonia Argentina. **Parasitology International**, Vol. 59, p. 626–628, 2010.

SPRENGER, L. K.; GREEN, K. T.; MOLENTO, M. B. Geohelminth contamination of public areas and epidemiological risk factors in Curitiba, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Vol. 23, p. 69-73, 2014.

STEFANIC, S.; SHAIKENOV, B. S.; DEPLAZES, P.; DINKEL, A.; TORGERSON, P. R.; MATHIS, A. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* (sheep strain) in naturally infected dogs, **Parasitology Research**, Vol. 92, p. 347–351, 2004.

STIJNIS, K.; DIJKMANS, A. C.; BART, A.; BROSENS, L. A.; MUNTAU, B.; SCHOEN, C.; BARTH, T. F.; VAN GULIK, T.; VAN GOOL, T.; GROBUSCH, M. P.; TAPPE, D. *Echinococcus vogeli* in immigrant from Suriname to the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 21, p. 528-530, 2015.

SUDAN, V.; JAISWAL, A. K.; SHANKER, D.; KANOJIYA, D.; SACHAN, A. Prevalence of endoparasitic infections of non-descript dogs in Mathura, Uttar Pradesh. **Journal of Parasitic Diseases**, Vol. 39, p. 491-494, 2015.

SZOSTAKOWSKA, B.; LASS, A.; KOSTYRA, K.; PIETKIEWICZ, H.; MYJAK, P. First finding of *Echinococcus multilocularis* DNA in soil: preliminary survey in Varmia-Masuria Province, northeast Poland. **Veterinary Parasitology**, Vol. 203, p. 73-79, 2014.

TACKMANN, K.; MATTIS, R.; CONRATHS, F. J. Detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes: evaluation of a protocol of the intestinal scraping technique. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, Vol. 53, p. 395-398, 2006.

THAKUR, A. S.; PREZIOSO, U.; MARCHEVSKY, N. Efficacy of droncit against *Echinococcus granulosus* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Vol. 39, p. 859-860, 1978.

THOMÉ, S. M.; LAFAYETTE, E. D. P.; PESSOA NETO, G. R. Contaminação ambiental por ovos de *Toxocara* spp. e *Ancylostoma* spp. em praças públicas da cidade de Duque de Caxias, estado do Rio de Janeiro. **Saúde & Ambiente em Revista**, Vol. 3, p. 30-32, 2009.

TORGERSON, P. R.; KELLER, K.; MAGNOTTA, M.; RAGLAND, N. The global burden of alveolar echinococcosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Vol. 4, 2010.

TORRES-CHABLÉ, O. M.; GARCÍA-HERRERA, R. A.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, M.; PERALTA-TORRES, J. A.; OJEDA-ROBERTOS, N. F.; BLITVICH, B. J.; BAAK-BAAK, C. M.; GARCÍA-REJÓN, J. E.; MACHAIN-WILIAMS, C. I. Prevalence of gastrointestinal parasites in domestic dogs in Tabasco, Southeastern Mexico. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Vol. 24, p. 432-437, 2015.

TRACHSEL, D.; DEPLAZES, P.; MATHIS, A. Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. **Parasitology**, Vol. 134, p. 911-920, 2007.

TRAVERSA, D.; FRANGIPANE DI REGALBONO, A.; DI CESARE, A.; LA TORRE, F.; DRAKE, J.; PIETROBELLI, M. Environmental contamination by canine geohelminths. **Parasites & Vectors**, Vol. 7, p. 67, 2014.

TUN, S.; ITHOI, I.; MAHMUD, R.; SAMSUDIN, N. I.; KEK HENG, C.; LING, L. Y. Detection of Helminth Eggs and Identification of Hookworm Species in Stray Cats, Dogs and Soil from Klang Valley, Malaysia. **PLoS One**, Vol. 10(12), 2015.

UMHANG, G.; FORIN-WIART, M. A.; HORMAZ, V.; CAILLOT, C.; BOUCHER, J. M.; POULLE, M. L.; FRANCK, B. *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. **Veterinary Parasitology**, Vol. 214, p. 75-79, 2015.

UMHANG, G.; RATON, V.; COMTE, S.; HORMAZ, V.; BOUCHER, J. M.; COMBES, B.; BOUE, F. *Echinococcus multilocularis* in dogs from two French endemic areas: no evidence of infection but hazardous deworming practices. **Veterinary Parasitology**, Vol. 188, p. 301-305, 2012.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 273 p.

UTUK, A.E.; SIMSEK, S.; KOROGLU, E.; MCMANUS, D. P. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. **Acta Tropica**, Vol. 107, p. 192–194, 2008.

VALSECCHI, J.; AMARAL, P. V. Perfil da caça e dos caçadores na reserva de desenvolvimento sustentável Amanã, Amazonas – Brasil. **Uakari**. Vol. 5, p. 33-48, 2009.

VALSECCHI, J.; EL BIZRI, H. R.; FIGUEIRA, J. E. C. Subsistence hunting of *Cuniculus paca* in the middle of the Solimões River, Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, Vol. 74, p. 560-568, 2014.

VAN DER GIESSEN, J. W. B.; ROMBOUT, Y. B.; FRANCHIMONT, J. H.; LIMPER, L. P.; HOMAN, W. H. Detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, Vol. 82, p. 49–57, 1999.

VAN KESTEREN, F.; PIGGOTT, K. J.; BENGUI, T.; KUBRI, S. B.; MASTIN, A.; SILLERO-ZUBIRI, C.; PARIS, M.; MILLAR, R. P.; MACDONALD, D. W.; SHIFERAW, F.; CRAIG, P. S. Helminth parasites in the endangered Ethiopian wolf, *Canis simensis*. **Journal of Helminthology**, Vol. 89, p. 487-495, 2015.

VANISCOTTE, A.; RAOUL, F.; POULLE, M. L.; ROMIG, T.; DINKEL, A.; TAKAHASHI, K.; GUISLAIN, M. H.; MOSS, J.; TIAOYING, L.; WANG, Q.; QIU, J.; CRAIG, P. S.; GIRAUDOUX, P. Role of dog behavior and environmental fecal contamination in transmission of *Echinococcus multilocularis* in Tibetan communities. **Parasitology**, Vol. 138, p. 1316–1329, 2011.

VEIT, P.; BILGER, B.; SCHAD, V.; SCHÄFER, J.; FRANK, W.; LUCIUS, R. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. **Parasitology**, Vol. 110, p. 79-86, 1995.

VIZCAYCHIPI, K. A.; HELOU, M.; DEMATTEO, K.; MACCHIAROLI, N.; CUCHER, M.; ROSENZVIT, M.; D'ALESSANDRO, A. First report of *Echinococcus vogeli* in a paca in Misiones province, Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, Vol. 45, p. 169-173, 2013.

VRDOLJAK, K. J.; CASSEL, N.; DVIR, E. Oesophagogastric intussusception associated with spirocercosis in a dog. **Journal of the South African Veterinary Association**, Vol. 85, p. 1065, 2014.

VUITTON, D. A.; ZHOU, H.; BRESSON-HADNI, S.; WANG, Q.; PIARROUX, M.; RAOUL, F.; GIRAUDOUX, P. Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. **Parasitology**, Vol. 127 (Suppl.), S87–S107, 2003.

WACHIRA, T. M.; MACPHERSON, C. N. L.; GATHUMA, J. M. Hydatid disease in the Turkana district of Kenya. VII. Analysis of the infection pressure between definitive and intermediate hosts of *Echinococcus granulosus* 1979-1988. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Vol. 84, p. 361-368, 1990.

WANG, Q.; RAOUL, F.; BUDKE, C.; CRAIG, P. S.; XIAO, Y. F.; VUITTON, D. A.; CAMPOS-PONCE, M.; QIU, D. C.; PLEYDELL, D.; GIRAUDOUX, P. Grass height and transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in Tibetan communities, China. **Chinese Medical Journal**, Vol. 123, p. 61–67, 2010.

WANG, X.; TEDFORD, R. H. **Dogs: Their Fossil Relatives and Evolutionary History**. Columbia University Press, Estados Unidos, 2010. 232 p.

WONG, S. K.; FEINSTEIN, L. H.; HEIDMANN, P. Healthy pets, healthy people. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Vol. 215, p.335-338, 1999.

WOODLAND, W. N. F. On the life-cycle of *Hymenolepis fraterna* (*H. nana* var. *fraterna* Stiles) of the white mouse. **Parasitology**, Vol. 16, p. 69–83, 1924.

XHAXHIU, D.; KUSI, I.; RAPTI, D.; KONDI, E.; POSTOLI, R.; RINALDI, L.; DIMITROVA, Z. M.; VISSER, M.; KNAUS, M.; REHBEIN, S. Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. **Parasitology Research**, Vol. 108, p. 341–353, 2011.

YAMAMOTO, N.; MORISHIMA, Y.; KON, M.; YAMAGUCHI, M.; TANNO, S.; KOYAMA, M.; MAENO, N.; AZUMA, H.; MIZUSAWA, H.; KIMURA, H.; SUGIYAMA, H.; ARAKAWA, K.; KAWANAKA, M. The first reported case of a dog infected with *Echinococcus multilocularis* in Saitama prefecture, Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Vol. 59, p. 351–352, 2006.

YU, S. H.; WANG, H.; WU, X. H.; MA, X.; LIU, P. Y.; LIU, Y. F.; ZHAO, Y. M.; MORISHIMA, Y.; KAWANAKA, M. Cystic and alveolar echinococcosis: an epidemiological survey in a Tibetan population in southeast Qinghai, China. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Vol. 61, p. 242–246, 2008.

ZARE-BIDAKI, M.; MOBEDI, I.; NADDAF, S. R.; KIA E. B.; MAHMOUDI, M.; PIAZAK, N.; NEKOUIE, H.; SADEGHIEH AHARI, S.; HABIBZADEH, S. H.; M SIAVASHI, M. Prevalence of *Echinococcus* spp. Infection Using Coproantigen ELISA among Canids of Moghan Plain, Iran. **Iran Journal of Public Health**, Vol. 38, p. 112-118, 2009.

ZHANG, W.; LI, J.; MCMANUS, D. P. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. **Clinical Microbiology Reviews**, Vol. 16, p. 18-36, 2003.

ZIADINOV, I.; MATHIS, A.; TRACHSEL, D.; RYSMUKHAMBETOVA, A.; ABDYJAPAROV, T. A.; KUTTUBAEV, O. T.; DEPLAZES, P.; TORGERSON, P. R. Canine echinococcosis in Kyrgyzstan: using prevalence data adjusted for measurement error to develop transmission dynamics models. **International Journal for Parasitology**, Vol. 38, p. 1179–1190, 2008.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(3 PÁGINAS)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa **“Avaliação de cães domésticos (*Canis familiaris*) na contaminação ambiental e transmissão da equinococose em área endêmica no Estado do Acre, Brasil”** sob responsabilidade da pesquisadora Rosângela Rodrigues e Silva do Serviço de Referência Nacional em Hidatidose do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ (SRNH-IOC/Fiocruz).

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

Caso você possua cão(es) e aceite participar dessa pesquisa, receberá uma cópia deste documento TCLE, as explicações sobre a pesquisa. Sua participação será permitir a coleta de fezes do(s) seu(s) animal(is) no interior da sua residência ou propriedade. Você também será entrevistado mediante a um questionário, para o fornecimento de dados para o seu cadastro, seus hábitos e costumes na relação com seu(s) cão(es), além de informações específicas sobre ele(s). Em algum momento da pesquisa você poderá ser solicitado para a permissão de uma nova coleta de fezes do(s) seu(s) animal(is).

Se você for proprietário(a) de cão(es), sendo menor de dezoito anos, poderá também consentir em participar da pesquisa, mas seu(s) responsável(is) legais deverá(ão) respaldar a sua participação.

Os possíveis riscos ou desconfortos para o(s) cão(es) são baixos, raros e se ocorrerem estão relacionados ao rápido período de contenção física, como medo e estresse, e ao emprego do laxativo, como “ardência retal” ou “reação alérgica”.

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

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

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

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

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

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

() Dispensio a necessidade de assinar novo consentimento a cada pesquisa, ou seja, o(s) material(is) biológico(s) do(s) seu(s) animal(is) poderá(ão) ser utilizado(s) para pesquisa futuras sem a necessidade de novo termo de consentimento livre e esclarecido.

Para esclarecimentos ou informações quanto a eticidade desta pesquisa, caso seja necessário, você poderá entrar em contato com os Comitês de Ética em Pesquisa (**Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP Fiocruz/IOC** - Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz - Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) - Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360 - Telefone: (21) 3882-9011 - Tel/Fax: (21) 2561-4815 – e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br - Skype: cep_fiocruz_ioc e **Comissão de Ética no Uso de animais da Fiocruz - CEUA/Fiocruz** - Avenida Brasil, 4.036 – sala 200, Expansão - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21.040-361 - Telefone: (21) 3882-9121 / e-mail: ceua@fiocruz.br).

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

Eu, _____,
fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e reavaliar a minha decisão de continuar participando se assim o desejar. Estou satisfeito(a) com as explicações e concordo em ceder meus dados, e informações, além de material biológico (fezes) do(s) meu(s) cão(es) para esta pesquisa. Fui alertado(a) de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Em caso de dúvidas poderei entrar em contato com a pesquisadora Rosângela Rodrigues e Silva nos telefones (21) 99626-3215 / (21) 2562-1505 / (21) 2562-1485 e pelo e-mail: rsilva@ioc.fiocruz.br. Declaro, assinando abaixo (ou colocando a minha digital) que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e que me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome (Assinatura do participante ou digital)

Data: ___ / ___ / ___.

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

Data: ___ / ___ / ___.

Nome (Assinatura do pesquisador)

Data: ___ / ___ / ___.

ANEXO B - QUESTIONÁRIO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DOS PONTOS DE COLETA (2 PÁGINAS)

Número do ponto de coleta: _____ Data: ____ / ____ / ____

Endereço do ponto de coleta: _____

Condições do tempo: () ensolarado () chuvoso () nublado

Temperatura ambiente (°C): _____

Amostra(s) de fezes de cães coletada(s):

() No interior da residência/propriedade () No peridomicílio

() Em local público. Qual? _____

Número de cães que circulam na residência / propriedade: _____

Raça dos cães da residência / propriedade: _____

- Alimentação dos cães:

() ração () restos de comida

() vísceras e/ou carcaças cruas de animais mortos. Quais? _____

- Hábitos dos cães:

Local onde o(s) cão(es) dorme(m):

() no interior da residência/propriedade. Onde? _____

() peridomicílio

() fora da propriedade

Local onde o(s) cão(es) defeca(m):

() no interior da residência/propriedade. Onde? _____

() peridomicílio

() fora da propriedade

O(s) cão(es) da propriedade circula(m) na rua: SIM () NÃO ()

O(s) cão(es) da rua circula(m) na área domiciliar? SIM () NÃO ()

Nome do responsável pela casa: _____

Quantidade de pessoas na casa: _____

As pessoas brincam com o(s) cão(es)? SIM () NÃO ()

Como é o contato das pessoas com o local onde o(s) cão(es) defeca(m)?

() plantação () apenas passam pelo local () sentam, brincam ou deitam no chão

Onde descartam as fezes dos cães? _____

Praticam caça? SIM () NÃO () Animais caçados: _____

**DADOS RELACIONADOS À COLETA DE AMOSTRAS DE FEZES
APÓS DEFECACÃO PRESENCIADA PELA EQUIPE:**

Visualização de amostras de fezes no ambiente do ponto de coleta? SIM () NÃO ()

Visualização do cão defecando? SIM () NÃO ()

Necessidade de contenção física e utilização de laxativo osmótico? SIM () NÃO ()

Nome do cão: _____ Raça: _____ Idade: _____

Sexo do cão: M () F () Tempo que o cão vive com a família: _____

O cão é alimentado com vísceras de animais? SIM () NÃO () Quais? _____

O cão parece doente (lento, magro, com feridas)? SIM () NÃO ()

Tempo de coleta após a eliminação das fezes: _____

Características das fezes coletadas: moldadas () diarreicas ()

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA: _____

ENTREVISTA REALIZADA POR: _____
(NOME DO INTEGRANTE DA EQUIPE)