

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

SILVIA GONÇALVES MESQUITA

**MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE FAMÍLIAS DE
TREMATÓDEOS PARASITOS DE MOLUSCOS DO GÊNERO *Biomphalaria*
PRESTON, 1910**

Belo Horizonte

2018

Silvia Gonçalves Mesquita

**MARCADORES MOLECULARES PARA FAMÍLIAS DE TREMATÓDEOS
TRANSMITIDOS POR MOLUSCOS DO GÊNERO *Biomphalaria* PRESTON, 1910**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de Concentração: Imunoparasitologia

Orientadora: Dr.^a Daniella Castanheira Bartholomeu

Coorientadora: Dr.^a Roberta Lima Caldeira

Belo Horizonte

2018

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NOS LABORATÓRIOS:

Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da dr^a. Daniella Castanheira Bartholomeu.

Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica- LHMM, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, sob a coorientação da dr^a Roberta Lima Caldeira.

COLABORAÇÕES:

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG:

Dr. Hudson Alves Pinto
Dr^a. Gabriela Flávia Rodrigues Luiz
Dr^a. Mariana dos Santos Cardoso
Dr. João Luis Reis Cunha

Coleção de Malacologia Médica – IRR/Fiocruz:

Dr^a Cristiane Lafetá Furtado de Mendonça
Amanda Domingues Araújo

Moluscário Lobato Paraense e Serviço Nacional de Referência em Esquistossomose-IRR/Fiocruz

ÓRGÃOS FINANCIADORES:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Maria
do Carmo Murta Gonçalves (*in*
memorian).

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me capacita e direcionada em cada passo.

Aos meus pais, Silvana Gonçalves Mesquita e Antônio Claret Mesquita, que sonham os meus sonhos, lutam pelas minhas conquistas e dividem comigo cada uma das minhas vitórias.

À minha querida avó, Maria do Carmo Murta Gonçalves (*in memoriam*), que sempre acreditou em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditava.

Aos meus familiares pelo suporte e pela torcida.

À dr^a Daniella Castanheira Bartholomeu por acreditar em mim e neste trabalho. Obrigada pela orientação impecável, sempre presente e disposta, por me ensinar tanto e buscar aprender tantas coisas junto comigo, por me acolher em seu grupo e me dar a oportunidade de contribuir com vocês.

À dr^a Roberta Lima Caldeira, que desde a minha iniciação científica me acompanha, aconselha, ensina e incentiva. Agradeço a oportunidade de novamente trabalhar com você.

Ao dr. Hudson Alves Pinto por sua sempre disposta colaboração, incentivo e interesse na execução desse projeto.

Aos drs. Gabriela Flávia Rodrigues Luiz, João Luis Reis Cunha e Mariana dos Santos Cardoso que com paciência, conhecimento e excelência contribuíram imensamente durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do LIGP pelo acolhimento e prazer da convivência diária.

Aos colegas do LHMM que mesmo de longe estiveram sempre muito presentes.

À turma do Piru, em especial às amigas: Zilda, Nat e Jess, pela amizade e por dividir comigo os dias difíceis fazendo deles mais leves.

À Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM) nas pessoas de dr^a Cristiane Lafeté Furtado de Mendonça e Amanda Domingues Araújo por ceder as amostras utilizadas nesse estudo e pela pronta disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À equipe do Moluscário Lobato Paraense e do Serviço de Referência Nacional em Esquistossomose que realizaram com muita excelência toda a preparação do material utilizado previamente a realização deste trabalho.

Aos muitos amigos que estiveram do meu lado ao longo desses dois anos, torcendo sempre por mim. Agradeço pelos ouvidos sempre dispostos, pelos conselhos, por me segurarem quando achei que não tinha mais forças e por compreenderem inúmeras vezes meu estresse e minha ausência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa do atual coordenador dr. Ricardo Toshio Fujiwara, pela oportunidade de fazer parte da casa e por fornecer o necessário para a conclusão do meu mestrado.

Aos professores do Departamento de Parasitologia por todo conhecimento transmitido.

À Sumara e Sibebe, que sempre com muita dedicação fizeram o possível para a realização do meu mestrado.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

“Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho.”
(C.S. Lewis)

RESUMO

A classe Trematoda compreende helmintos cujo ciclo de vida é complexo passando por diferentes hospedeiros durante o seu desenvolvimento. Por atuarem como hospedeiros intermediários, moluscos do gênero *Biomphalaria* são imprescindíveis para a manutenção do ciclo biológico de diversos trematódeos. É importante identificar corretamente esses parasitos uma vez que, alguns deles, podem apresentar impactos na saúde humana e animal, econômicos e ecológicos. A taxonomia de trematódeos baseada em caracteres morfológicos do estágio larval é metodologicamente complicada, apontando para a necessidade de novas técnicas auxiliares capazes de identificar esses parasitos em qualquer fase evolutiva do seu ciclo. A morfologia das larvas dos trematódeos é semelhante entre si, inclusive semelhante às de *S. mansoni*, por vezes levando a diagnósticos incorretos resultando em ações de vigilância desnecessárias. Nesse contexto, o uso de marcadores moleculares surge como uma alternativa importante. Esse trabalho se propõe a identificar marcadores moleculares capazes de diferenciar quatro importantes famílias de trematódeos transmitidas por moluscos do gênero *Biomphalaria* na região neotropical. São essas: Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae. Utilizando a ferramenta online TipMT, desenvolvida pelo nosso grupo, foram desenhados iniciadores família-específicos direcionados para o DNA ribossomal visando sua utilização em PCR multiplex, uma técnica que apresenta alta especificidade, baixo custo e simples execução. Como molde para as reações, foram utilizadas amostras de larvas de trematódeos liberadas por moluscos do gênero *Biomphalaria* e amostras de moluscos parasitados, depositadas na Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM). Os iniciadores se mostraram eficazes na identificação e diferenciação das quatro famílias nas mesmas condições da PCR. A especificidade dos iniciadores foi avaliada, não havendo amplificação inespecífica de outros trematódeos, nematódeo e espécies de *Biomphalaria* presentes no território brasileiro. Os iniciadores se mostraram sensíveis na faixa de 0,1 ng a 1 µg de DNA do parasito. Essa metodologia também se mostrou eficaz para a detecção de coinfeccção. Através de uma única metodologia rápida e precisa é possível realizar o exame de infectividade e a identificação da família do parasito. A identificação em nível de família fornece importantes informações sobre prováveis hospedeiros definitivos e impactos gerados na região da coleta possibilitando assim, o delineamento de melhores estratégias de controle.

Palavras-chave: Trematódeos. *Biomphalaria*. Marcadores moleculares. Taxonomia integrada. PCR multiplex.

ABSTRACT

The Trematoda class encompasses helminths whose life cycle is complex passing through different hosts during its development. Because *Biomphalaria* snails act as intermediate hosts, they are very important for the maintenance of the biological cycle of several trematodes. It is important to properly recognize and identify trematode parasites that infect *Biomphalaria*, since different groups may have an impact on human and animal health, besides economical and ecological impacts. The taxonomy based on morphological characters of the larval form of trematodes is methodologically complicated, highlighting the need for new auxiliary techniques capable of identifying these parasites at any evolutionary stage of their cycle. Therefore, molecular tools appear as an attractive alternative. This work aims at identifying molecular markers capable of distinguishing four important families of trematodes, Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae and Strigeidae, all transmitted by molluscs of the genus *Biomphalaria* in the neotropical region. Using the online tool TipMT, developed by our group, we have designed trematode family-specific primers targeting the ribosomal DNA region optimized to be used in multiplex PCR, a technique that presents high specificity, low cost and simple execution. gDNA samples of the trematode larvae shed by molluscs of the genus *Biomphalaria* and from parasitized molluscs from the Medical Malacology Collection (Fiocruz-CMM) were used as a template for the PCR reactions. The panel of primers identified in this study was effective in identifying and distinguishing the four trematode families at the same PCR condition. The specificity of the primers was confirmed using gDNA obtained from other trematodes families, nematode and *Biomphalaria* species present in the Brazilian territory. The primers were sensitive in the range of 0.1 ng to 1 ag of DNA of the parasite. This methodology was also effective for the detection of coinfections. Through a simple, fast and accurate methodology, it is possible to accurately identify and distinguish the trematode families included in this study in biological samples in a single PCR reaction. A family level identification provides important information about probable hosts and impacts generated in the affected region, thus allowing the designing of better strategies to control.

Keywords: Trematodes. *Biomphalaria*. Molecular markers. Integrated taxonomy. Multiplex PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática do ciclo biológico geral dos trematódeos. A linha tracejada destaca as etapas que ocorrem em meio aquático.	19
Figura 2: <i>Biomphalaria glabrata</i> .	20
Figura 3: Representação esquemática do ciclo biológico dos esquistossomatídeos de aves causadores da dermatite cercariana.	22
Figura 4: Reação alérgica causada pela penetração de cercarias de esquistossomatídeos de aves na pele de humanos.	23
Figura 5: Alguns tipos cercarianos verificados em moluscos no Brasil.	26
Figura 6: Algumas características morfológicas gerais avaliadas no estudo de larvas de trematódeos.	26
Figura 7: Porcentagem de estudos de taxonomia, diversidade, ciclo biológico, variação populacional, diagnóstico específico e filogenia de trematódeos utilizando marcadores moleculares.	28
Figura 8: Porcentagem de estudos de taxonomia, diversidade, ciclo biológico, variação populacional, diagnóstico específico e filogenia de trematódeos usando cada um dos marcadores moleculares mais comuns: 18S, ITS, 28S, COI ou outros genes.	28
Figura 9: Representação gráfica do resultado das análises morfológicas das cercarias depositadas na Fiocruz-CMM.	54
Figura 10: Representação gráfica do resultado das análises morfológicas agrupado por famílias.	56
Figura 11: Teste de especificidade da reação utilizando o par de iniciadores Clin 4F-4R	59
Figura 12: Teste de especificidade da reação utilizando o par de iniciadores Echi 1F-1R	59
Figura 13: Teste de especificidade da reação utilizando o par de iniciadores Schis 2F-2R	60
Figura 14: Teste de especificidade da reação utilizando o par de iniciadores Strig 5F-5R	60
Figura 15: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Clin 4F-4R	61
Figura 16: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Echi 1F-1R	61

Figura 17: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Schis 2F-2R	61
Figura 18: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Strig 5F-5R	62
Figura 19: Simulação de coinfeções	62
Figura 20: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Clin 4F-4R na detecção de coinfeção	63
Figura 21: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Echi 1F-1R na detecção de coinfeção	63
Figura 22: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Schis 2F-2R na detecção de coinfeção	63
Figura 23: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Strig 5F-5R na detecção de coinfeção	64
Figura 24: Teste de detecção de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> pelo par de iniciadores Schis 2F-2R utilizando 50ng de DNA de amostras de <i>Biomphalaria</i>	64
Figura 25: PCR multiplex utilizando os iniciadores Clin 4F-4R, Echi 1F-1R, Schis 2F-2R e Strig 5F-5R para identificação e diferenciação das famílias.	65
Figura 26: Teste de especificidade da PCR multiplex	66
Figura 27: Detecção de coinfeção pela PCR multiplex	67
Figura 28: Representação gráfica dos resultados obtidos pela identificação por técnicas morfológicas e moleculares das cercarias.	70
Figura 29: Representação gráfica dos resultados da identificação molecular das cercarias.	71
Figura 30: Validação da PCR multiplex utilizando como molde para a reação 50ng de DNA de amostras de cercarias obtidas na Fiocruz-CMM.	71
Figura 31: Representação gráfica do resultado da identificação por famílias das cercarias por técnicas moleculares.	72
Figura 32: Representação gráfica do resultado da identificação por técnicas moleculares das amostras de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> infectadas.	74
Figura 33: Representação gráfica do resultado da identificação por famílias por técnicas moleculares das amostras de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> infectadas.	75
Figura 34: Teste cego da PCR multiplex	77
Figura 35: Árvore filogenética demonstrando a relação entre sequências parciais do	79

gene 18S do rDNA	
36: Árvore filogenética demonstrando a relação entre sequências da região ITS do rDNA	80
Figura 37: Alinhamento obtido entre amostras sequenciadas neste estudo (18040, 18042 e 18044) e amostra referência para família Notocotylidae obtida no NCBI (JQ766940.1).	82
Figura 38: Representação gráfica da situação atual da identificação de cercarias depositadas na Fiocruz-CMM.	92
Figura 39: Representação gráfica dos resultados obtidos neste trabalho após análises morfológicas e moleculares agrupados por famílias.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Amostras de cercarias utilizadas nesse estudo descritas conforme sua identificação no Livro de Tombo da Coleção de Malacologia Médica (FIOCRUZ-CMM).	36
Tabela 2- Amostras de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> infectados com larvas de trematódeos utilizados neste estudo.	38
Tabela 3- Sequências de rDNA de espécies de trematódeos pertencentes a famílias já relatadas em <i>Biomphalaria spp.</i> utilizadas para o desenho de iniciadores.	43
Tabela 4- Amostras de cercarias sequenciadas.	49
Tabela 5- Iniciadores universais para trematódeos utilizados para o sequenciamento nucleotídico	51
Tabela 6- Resultado das análises morfológicas das amostras de cercarias depositadas na Fiocruz-CMM feitas neste estudo.	55
Tabela 7- Iniciadores família específicos desenhados pela ferramenta online TipMT.	57
Tabela 8- Iniciadores família-específicos direcionados para a região ITS do rDNA selecionados para o estudo.	58
Tabela 9- Resultados da identificação por técnicas moleculares das amostras de cercarias.	67
Tabela 10- Resultados da identificação de trematódeos por técnicas moleculares a partir de amostras de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> infectados.	72
Tabela 11- Regiões sequenciadas das amostras de cercarias.	77
Tabela 12- Situação atual da identificação de cercarias depositadas na Fiocruz-CMM.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AFA	Fixador a base de álcool, formalina e ácido acético
ag	Atograma
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
COI	Citocromo C Oxidase Subunidade I
CRIA	Centro de Referência em Informação Ambiental
da	Dalton
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
e-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Eletrônica
et al	E Colaboradores
fg	Fentograma
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Fiocruz-CMM	Coleção de Malacologia Médica
g	Força G
gDNA	DNA genômico
GTR	Generalized Time Reversible
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IN	Norma Técnica do Ibama
IRR	Instituto René Rachou
ITS	Espaçadores Transcritos Internos
LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i>
LHMM	Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica
M	Molar
MA	Maranhão
MG	Minas Gerais
min	Minuto
ml	Mililitro
ML	Máxima Verossimilhança

mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
MS	Mato Grosso do Sul
mtDNA	DNA mitocondrial
N/A	Não se aplica
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND1	NADH Desidrogenase Subunidade I
ng	Nanograma
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
rDNA	DNA ribossomal
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
s	Segundo
SNRE	Serviço Nacional de Referência em Esquistossomose
Taq	DNA polimerase termostável derivada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TipMT	Tool for Identification of Primers for Multiple Taxa
TM	Temperatura de Anelamento
U/ul	Unidades por Microlitro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
ul	Microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1 Classe Trematoda	19
1.1 Moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> : os hospedeiros intermediários	20
1.2 Taxonomia dos Trematódeos	25
2 Marcadores Moleculares	27
3 Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM)	29
JUSTIFICATIVA	31
OBJETIVOS	33
Objetivo Geral	34
Objetivos Específicos	34
METODOLOGIA	35
1 Amostras utilizadas	36
2 Obtenção do Material Biológico	41
3 Análises Morfológicas e Morfométricas das Cercarias	42
4 Obtenção das Sequências Nucleotídicas em Banco de Dados Públicos	42
5 Desenho dos Iniciadores	43
6 Padronização das técnicas moleculares	44
6.1 Extração do DNA total	44
6.1.1 Cercarias	44
6.1.2 Fragmento de Molusco Infectado	45
6.2 Reação em Cadeira da Polimerase (PCR)	45
6.2.1 Teste de especificidade	46
6.2.2 Teste de sensibilidade	46
6.2.3 Teste de coinfeção simulada	47
6.2.4 Teste de sensibilidade da coinfeção simulada	47
6.2.5 Teste de detecção da infecção por <i>S. mansoni</i> em amostras de <i>Biomphalaria</i> spp.	47

6.3	PCR Multiplex	47
6.3.1	Teste de especificidade	48
6.3.2	Teste de coinfeção simulada	48
6.4	Validação da técnica	48
7	Sequenciamento Nucleotídico e Análises Filogenéticas	49
RESULTADOS		53
1	Análise morfológicas e morfométricas	54
2	Desenho dos iniciadores	57
3	Padronização dos iniciadores	58
4	PCR Multiplex	64
5	Validação	67
5.1	Amostras de cercarias obtidas na Fiocruz-CMM	67
5.2	Amostras de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> infectados depositados na Fiocruz-CMM	72
5.3	Amostras de cercarias cedidas pelo Laboratório de Biologia dos Trematódeos (Parasitologia/ICB/UFMG)	76
6	Sequenciamento Nucleotídico e Análises Filogenéticas	76
7	Situação atual da identificação das cercarias obtidas na Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM)	83
DISCUSSÃO		93
CONCLUSÕES		103
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS		105
ANEXOS		114
ANEXO 1- Procedimento Operacional Padrão (POP) - Fixação, Registro e Armazenamento de Cercarias no LHMM		115
ANEXO 2- Comprovante do Depósito da Patente “Kit e Método para Diagnóstico Molecular Diferencial de Trematódeos”.		119

1 Classe Trematoda

Pertencente ao filo Platyhelminthes, a classe Trematoda compreende helmintos cujo ciclo de vida é bastante complexo passando por diferentes hospedeiros durante o seu desenvolvimento, sendo mais comum a passagem por três hospedeiros. No hospedeiro vertebrado, os trematódeos atingem a maturidade sexual e realizam reprodução sexuada, resultando na liberação de ovos através das fezes no ambiente que, quando em contato com meio aquático, darão origem à fase larval denominada miracídio. Para completar seu desenvolvimento, é necessária a infecção do hospedeiro intermediário, que na maioria das vezes são moluscos da classe Gastropoda, onde realizam reprodução assexuada. Em condições ideais de temperatura, luminosidade e oxigenação, os moluscos eliminam no ambiente a fase larval denominada cercaria capaz de infectar novamente o hospedeiro definitivo ou um segundo hospedeiro intermediário que podem ser moluscos, artrópodes, anelídeos ou vertebrados. Neste segundo hospedeiro intermediário formam-se as metacercarias capazes de infectar um novo hospedeiro mediante a ingestão do hospedeiro intermediário pelo definitivo (Figura 1) (PINTO; MELO, 2013)

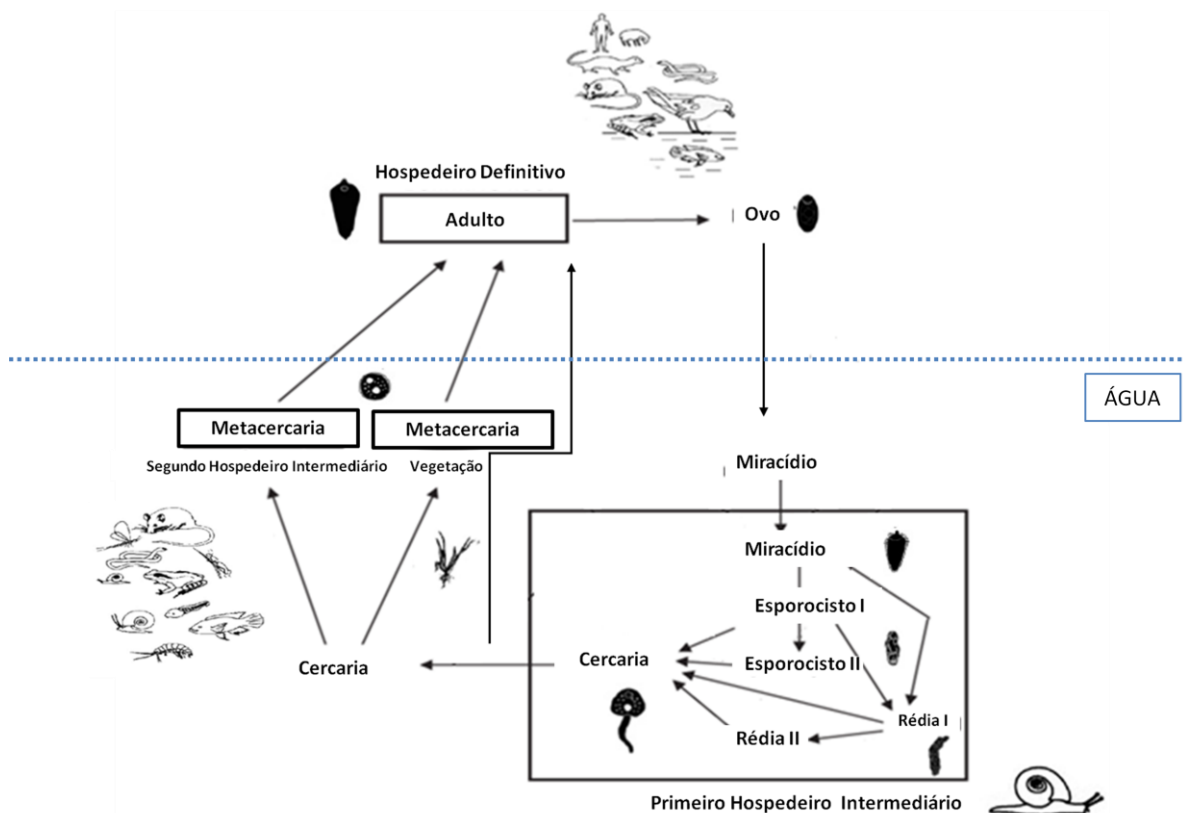


Figura 1: Representação esquemática do ciclo biológico geral dos trematódeos. A linha tracejada destaca as etapas que ocorrem em meio aquático.

1.1 Moluscos do gênero *Biomphalaria*: os hospedeiros intermediários

Para que se complete o ciclo biológico de um parasito em uma determinada localidade, a presença do seu hospedeiro intermediário é condição fundamental. Portanto, o conhecimento da sua biologia se faz importante para o entendimento da doença e delineamento de métodos de controle (BRASIL, 2014).

Biomphalaria glabrata (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Figura 2) são bastante conhecidos por atuarem como hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, trematódeo causador da esquistossomose mansoni, uma doença de grande relevância no território nacional. Estes moluscos são considerados como bons vetores devido a sua ampla distribuição, grande capacidade colonizadora em ambientes diversos, hermafroditismo, rápida maturação sexual e grande capacidade reprodutiva (BRASIL, 2014).



Figura 2: *Biomphalaria glabrata*.
Fonte: Fiocruz, 2017

Apesar de serem comumente associados à transmissão da esquistossomose, moluscos do gênero *Biomphalaria* também atuam como primeiros hospedeiros intermediários de outros trematódeos capazes de gerar impactos na saúde humana e animal, e também na economia, sobretudo na piscicultura (MOSZCZYNSKA et al., 2009).

Outros representantes da família Schistosomatidae, como os trematódeos do gênero *Trichobilharzia*, também utilizam *Biomphalaria* como seu primeiro hospedeiro intermediário. Aves aquáticas são os seus hospedeiros definitivos, entretanto, esses organismos são capazes de infectar acidentalmente humanos causando a dermatite cercariana, uma condição alérgica gerada a partir da penetração ativa das cercarias na pele em meio aquático (Figura 3).

Contudo, esses parasitos morrem ainda na pele, não chegando a desenvolver seu ciclo biológico em humanos (HORÁK et al., 2015). As reações imediatas são caracterizadas por coceira, aumento de sensibilidade da pele, vermelhidão e pápulas locais em resposta à penetração das cercarias (Figura 4). Apesar de não evoluir para um estado grave, a exposição contínua à fonte de infecção pode levar ao desenvolvimento da dermatite cercariana de fase aguda, caracterizada por uma intensa reação alérgica, febre, edema e urticárias generalizadas, e de fase crônica, caracterizada por lesões papulares eritematosas, generalizadas e/ou localizadas na região urogenital, com prurido intenso e inchaço o de lifonodos (CAMPRUBÍ et al., 2017). Além disso, a dermatite cercariana pode levar ao desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias devido à coceira causada por essa condição (KOLAROVA et al., 2013). As manifestações da dermatite cercariana são extremamente desagradáveis para o hospedeiro, porém, são passageiras levando de algumas horas até algumas semanas para a remissão total das lesões, nos casos de evolução para a fase crônica (PINTO et al., 2012). A dermatite cercariana está frequentemente associada a atividades de lazer (KOLAROVA et al., 2013) ou a atividades profissionais em ambientes aquáticos, sobretudo em locais de plantação de arroz onde frequentemente são encontrados todos os organismos necessários para a ocorrência do parasito (moluscos, aves domésticas e selvagens, e o homem) (JOSHI; PHIL, 2002). O diagnóstico da dermatite cercariana é predominantemente clínico baseado no histórico de visitação de cursos d'água pelo paciente e a presença de erupções na pele, sobretudo em partes do corpo que entraram em contato com a água. Entretanto, a diferenciação entre a dermatite cercariana causada por *S. mansoni* ou por outras cercarias da família Schistosomatidae é de difícil realização, o que pode levar a erros de diagnóstico e de tratamento precoce. Além disso, a dermatite cercariana também pode ser confundida com reações à picada de insetos, dermatites bacterianas ou de contato, ou outras reações alérgicas (KOLAROVA et al., 2013). Camprubí e colaboradores (2017) determinaram com sucesso a espécie causadora da dermatite cercariana crônica através da realização da reação de LAMP (amplificação isotérmica mediada por *loop*) a partir de fragmentos de pele retirados por biópsia. Seu estudo reforça a importância e aplicabilidade do uso de marcadores moleculares para solução de problemas na identificação e diagnóstico de trematódeos. Não existe um tratamento específico para a dermatite cercariana por esquistossomatídeos de aves, entretanto, é feito um tratamento para alívio dos sintomas do hospedeiro (HORÁK et al., 2015). O número de casos reportados de dermatite cercariana vem aumentando ao longo dos últimos anos, indicando a necessidade de maiores atenções para ocorrência e correto diagnóstico desses parasitos. Apesar de não ser uma doença que oferece grandes riscos para a saúde

pública, a dermatite cercariana é uma condição extremamente desagradável para o portador e que, em caso de surto, pode levar a interdição de algumas áreas de banho e lazer, causando impactos econômicos consideráveis, sobretudo em regiões onde o ecoturismo representa uma importante fonte de renda (CARON et al., 2017). São conhecidos diversos focos de dermatite cercariana na Europa e América do Norte, mas ainda não há registros de sua ocorrência no Brasil. Esquistossomatídeos de aves já foram relatados em território nacional, dessa forma, acredita-se que a ausência de registros dessa parasitose pode ser devido às limitações no diagnóstico (PINTO et al.,2012).

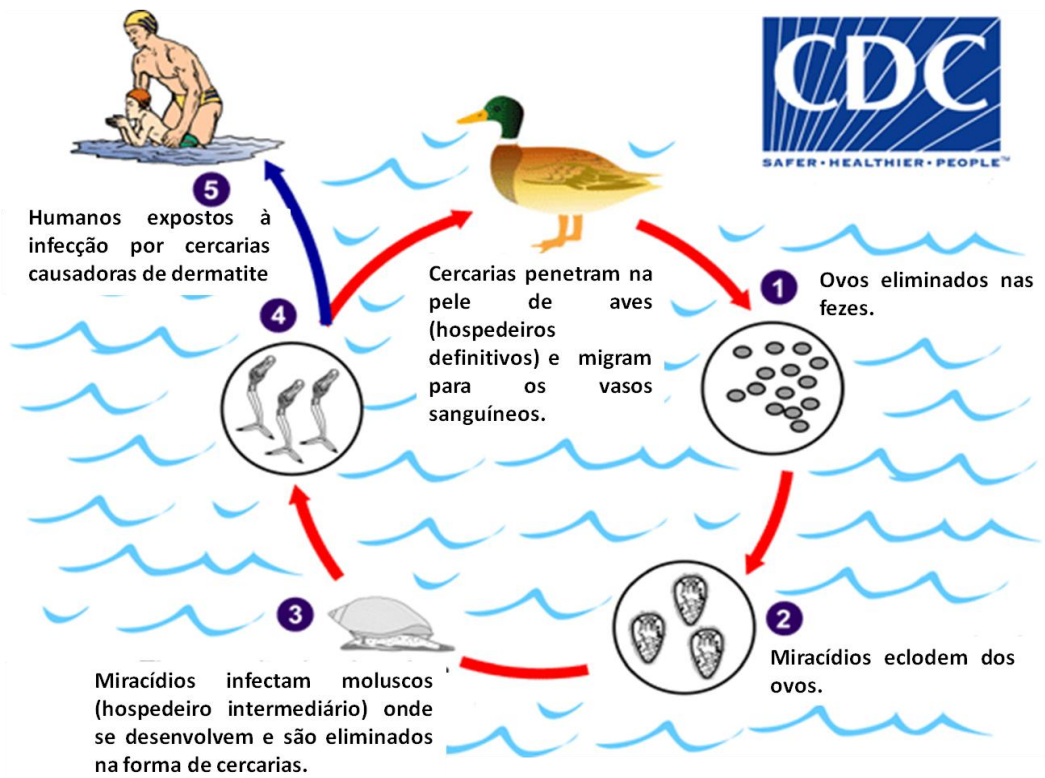


Figura 3: Representação esquemática do ciclo biológico do esquistossomatídeos de aves causadores da dermatite cercariana.

Fonte: CDC, 2018- adaptado.



Figura 4: Reação alérgica causada pela penetração de cercarias de esquistossomatídeos de aves na pele de humanos.

Fonte: Camprubí et al., 2017

Trematódeos de outras famílias também podem ser encontrados parasitando moluscos do gênero *Biomphalaria*. A família Echinostomatidae é composta por parasitos de intestino de vertebrados e é considerada a maior família da classe Trematoda devido ao grande número de espécies que a compõe (MATOS et al., 2017). Pinto e colaboradores (2016) encontraram cercarias de *Drepanocephalus* spp. em *B. straminea* provenientes de Belo Horizonte/MG, sendo o seu primeiro registro em moluscos deste gênero na América do Sul. Os trematódeos do gênero *Drepanocephalus* são parasitos do intestino de aves que se alimentam de peixes. Os peixes, portanto, se comportam como segundo hospedeiros intermediários e sofrem impactos em seu desenvolvimento devido ao parasitismo. Dessa forma, esse gênero apresenta importância econômica podendo levar a grandes perdas na piscicultura. Já os trematódeos do gênero *Riberoia* são parasitos de aves e mamíferos conhecidos pela sua capacidade de causar má formação, alta mortalidade e até mesmo extinção local de anfíbios (segundo hospedeiro intermediário) na América do Norte, gerando impactos ecológicos. Pinto e colaboradores (2013) descreveram pela primeira vez a presença de cercarias de *Riberoia* em *B. straminea* no Brasil, destacando esse molusco como um novo hospedeiro intermediário do parasito. Outros equinostomatídeos também se destacam por causarem impactos no desenvolvimento de larvas de anfíbios (HOLLAND et al., 2007, HOLLAND, 2010 e MARINO et al., 2014). Representantes dessa família também podem causar infecções em humanos, como é o caso de espécies do gênero *Echinostoma*, causadoras da equinostomíase humana. A equinostomíase é uma doença inflamatória adquirida através da ingestão alimentos contaminados com metacercárias de *Echinostoma*, que uma vez dentro do homem, desenvolvem-se até a fase adulta e permanecem alojados no trato gastrointestinal (SAH et al., 2018). Normalmente é uma doença assintomática, porém pode evoluir para infecções graves com náuseas, vômito,

diarreia, febre, dor abdominal e perda de peso (CDC, 2018; TOLEDO et al., 2014). A equinostomíase humana está associada à cultura alimentar de ingestão de peixes e moluscos crus ou mal cozidos (GRACZYK; FRIED, 1998).

Representantes da família Clinostomidae, como trematódeos do gênero *Clinostomum*, são parasitas bem distribuídos em todo o globo cujos hospedeiros definitivos são aves piscívoras. Também podem ser transmitidos por moluscos do gênero *Biomphalaria*, e foram detectados por Pinto e colaboradores (2015) em *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* na região da Pampulha em Belo Horizonte/MG. São parasitos que utilizam peixes como segundos hospedeiros intermediários. Apresentam um grande potencial patogênico em aves e peixes, mais uma vez ressaltando os impactos econômicos de trematódeos na piscicultura. Destacam-se pela capacidade de infectar acidentalmente humanos a partir da ingestão de carne de peixe crua contaminada com metacercarias. Existem relatos da espécie *Clinostomum complanatum* causando laringofaringite aguda no Japão e na Coreia, e de infecção ocular por uma espécie de *Clinostomum spp.* na Tailândia (CHUNG et al., 1995; TIEWCHALOERN et al., 1999; PARK et al., 2009; JUNG et al., 2015; LEE et al., 2017). Em todos esses casos, não houve evolução para quadro grave e a cura ocorreu mediante a remoção do parasito adulto.

Trematódeos da família Strigeidae, por sua vez, são parasitos de intestino e fígado de aves e mamíferos, e apresentam uma distribuição global (HERNÁNDEZ-MENA et al., 2014). É uma família rica em espécies que possuem grande especificidade quanto ao hospedeiro definitivo, sendo este o critério para a separação de duas subfamílias: Strigeinae, que são os parasitos de aves e compreende a maior parte dos organismos da família; e Duboisiellinae, que são parasitos de mamíferos e compreende apenas um gênero, *Duboisiella* (BLASCO-COSTA et al., 2016a; NIEWIAOMSKA, 2002). Um estrigeídeo pertencente ao gênero *Cotylurus* já foi reportado infectando humanos na China, entretanto, não há maiores informações sobre a forma de infecção, sintomatologia e tratamento (FRIED et al., 2004). Em um estudo realizado no período de 1990 a 1996, cercarias pertencentes à família Strigeidae foram encontradas em *B. tenagophila* na região metropolitana de Belo Horizonte/MG (SOUZA et al., 1998). Em 2013, Pinto encontrou cercarias do gênero *Apharyngostrigea* em *B. straminea* na região da Pampulha em Belo Horizonte/MG.

Outras famílias de trematódeos também já foram relatadas sendo transmitidas por moluscos na região neotropical como Diplostomidae, Notocotylidae, Spirorchiidae, Psilostomatidae (PINTO, 2013).

A verificação da infecção por trematódeos em moluscos do gênero *Biomphalaria* se dá através da realização do exame parasitológico de exposição à luz artificial em um recipiente

com água e/ou esmagamento do molusco entre placas de vidro. No primeiro caso, atraídas pela luz, as cercarias liberadas pelo molusco nadam até a superfície do recipiente, como ocorre na natureza. No caso do esmagamento do molusco entre placas de vidro, além da observação das cercarias, é possível também detectar a presença de esporocistos e rédias, principalmente na glândula digestiva e na região cefalopodal do molusco. As cercarias obtidas através de ambos os métodos de exame podem então ser analisadas quanto a sua morfologia para diagnóstico do tipo cercariano ao qual ela pertence (LOKER et al., 1982).

1.2 Taxonomia dos Trematódeos

A identificação taxonômica dos trematódeos é baseada exclusivamente na morfologia do parasito adulto e é dificultada pelo tamanho reduzido e a escassa quantidade de caracteres morfológicos diagnósticos. Quando se trata da identificação em estágios larvais, a dificuldade aumenta ainda mais, uma vez que as cercarias são morfológicamente muito diferentes dos adultos, seu tamanho é ainda mais reduzido e os caracteres morfológicos, difíceis de serem observados, não sendo capazes de diferenciar a maioria das espécies (FALTÝNKOVÁ et al., 2016). Nesse estágio de vida, os trematódeos podem ser identificados quanto ao tipo cercariano que, na maioria dos casos, pode ser associado à família a qual o trematódeo pertence. Em geral, é necessário que haja infecção experimental de hospedeiros para completar o ciclo de vida para que seja possível a identificação do parasito adulto.

O estudo da forma larval de cercarias deu início em 1737, quando Jam Swammwedam detectou pela primeira vez uma cercaria após a dissecação de um molusco, entretanto, nomeou a forma observada como Infusoria, nome relacionado a organismos do filo Protozoa. O termo “cercaria” foi originalmente criado por Otto Friedrich Muller somente em 1787 e a primeira associação entre a cercaria e a forma adulta foi realizada em 1882 (FALTÝNKOVÁ et al., 2016). Lühe (1909) combinou todos os dados morfológicos conhecidos para cercaria, classificando-as por tipos cercarianos. Essa classificação vem sendo constantemente revista e atualizada por diversos autores. São descritos atualmente 25 tipos cercarianos diferentes sendo os mais comuns no Brasil demonstrados na figura 5. Para a classificação em tipos cercarianos são observados alguns caracteres morfológicos da cercaria, como: tipo de cauda (simples, bifurcada, brevifurcada, longifurcada, com ou sem membrana natatória), disposição das ventosas e glândulas de penetração, características do sistema digestivo e excretor, presença e disposição de órgãos sensoriais (ocelos pigmentados ou não, pelos sensitivos e espinhos), entre outros caracteres (Figura 6) (PINTO;MELO, 2013).

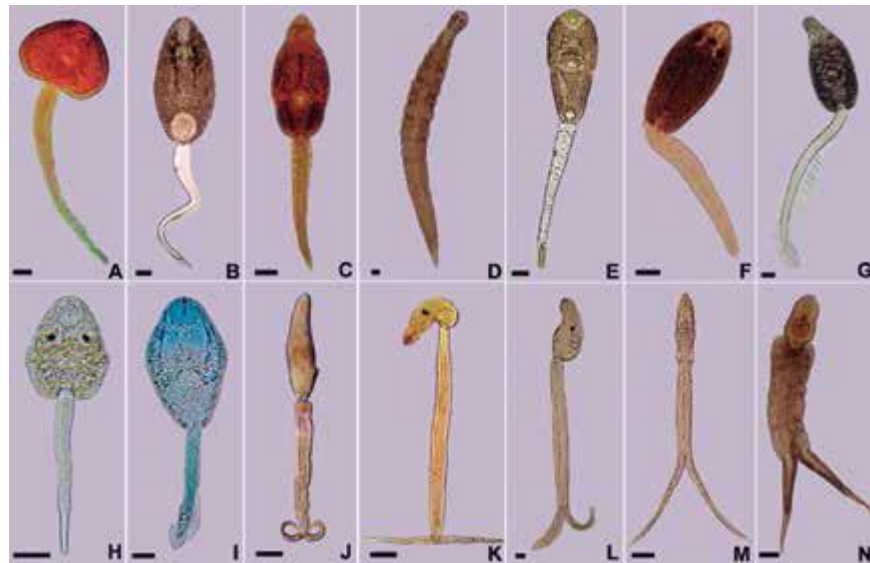


Figura 5: Alguns tipos cercarianos verificados em moluscos no Brasil.

(A) Gimnocéfala (cercária de *Fasciola hepatica*), (B) Anfistoma, (C) Equinostoma, (D) Magnacauda, (E) Megalura (*Philophthalmus gralli*), (F) Monostoma, (G, H) Pleurolofoerca, (I) Xifidiocercária, (J) Distoma brevifurcada afaringeada (cercária de *Schistosoma mansoni*), (K) Distoma brevifurcada faringeada (*Clinostomum* sp.), (L) Distoma brevifurcada faringeada (Spirorchiidae), (M) Distomalongifurcada faringeada (Estrigeocercária), (N) Distoma longifurcada faringeada com tronco caudal largo (*Apharyngostrigea* sp.). Escalas: 50 µm.

Fonte: Pinto e Melo, 2013.

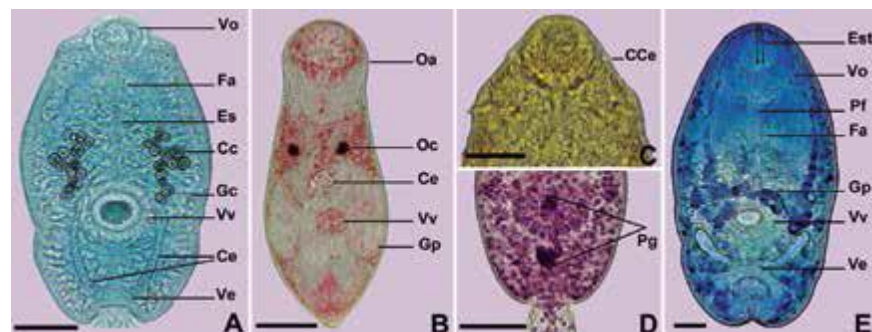


Figura 6: Algumas características morfológicas gerais avaliadas no estudo de larvas de trematódeos: (Ce) cecos, (Cce) collar cefálico com espinhos, (Cc) concreções circulares, (Es) esôfago, (Est) estilete, (Fa) faringe, (Gc) glândulas cistogênicas, (Gp) glândulas de penetração, (Oa) órgão anterior, (Oc) ocelos, (Pg) primórdio genital, (Pf) pré-faringe, (Ve) vesícula excretora, (Vo) ventosa oral, (Vv) ventosa ventral. Colorações empregadas: (A, E) sulfato azul do Nilo, (B) vermelho neutro, (C) solução de Lugol, (D) carmim acetoalúmen. Escalas: 50 µm.

Fonte: Pinto e Melo, 2013.

Atualmente a maior parte das cercarias conhecidas ainda não foram associadas a sua forma adulta e, dessa forma, permanecem classificadas quanto ao seu tipo cercariano ou com

nomenclaturas dadas por autores de acordo com algumas características observadas como é o caso das cercarias chamadas de macrogranulosas, ocelíferas, cataratinguensis, lutzi, acaudata, entre outros.

Nesse contexto, surge a necessidade de definir marcadores moleculares como uma potencial ferramenta para a identificação específica entre espécies e em qualquer estágio do ciclo de vida (MOSZCZYNSKA et al., 2009). Faltýnková e colaboradores (2016) recomendam a utilização da taxonomia clássica integrada às abordagens moleculares como a solução para as dificuldades de identificação específica das cercarias, uma vez que uma abordagem molecular oferece vantagens metodológicas significativas.

2 Marcadores Moleculares

Diante das limitações que a taxonomia clássica apresenta na identificação de trematódeos, sobretudo em seus estágios larvais, técnicas moleculares se destacam como potenciais ferramentas para a resolução desses problemas. O surgimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento de DNA cada vez mais acessível oferecem aos taxonomistas um novo caminho para superar as limitações da taxonomia clássica uma vez que permitem não apenas a identificação de espécies, mas também, estudos relacionados à plasticidade fenotípica, relações filogenéticas, diagnóstico, ciclo biológico e variações geográficas.

Blasco-Costa e colaboradores (2016b) realizaram um levantamento bibliográfico analisando 252 publicações do período de 2011 a 2015 e perceberam algumas tendências quanto ao uso da biologia molecular no estudo dos trematódeos. De forma geral, a partir de 2012, houve um aumento do número de estudos utilizando pelo menos um marcador molecular, porém 45% dos estudos com fins taxonômicos não utilizou nenhum marcador, baseando-se apenas em nas análises morfológicas e morfométricas. Mais de 50% dos estudos relacionados à diversidade de trematódeos, 35% dos estudos relacionados à elucidação de ciclo biológico, e 40% dos estudos de diagnóstico específico (identificação) e variação populacional utilizaram um ou dois marcadores moleculares (Figura 7). Os marcadores moleculares mais utilizados nos trabalhos avaliados foram a região do DNA ribossomal (sobretudo a porção 28S e os espaçadores transcritos internos- ITS 1 e 2) e o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI). A utilização desses marcadores em cada estudo variou de acordo com o objetivo do mesmo, uma vez que, por evoluírem em taxas diferentes, cada gene fornece um tipo diferente de informação (Figura 8).

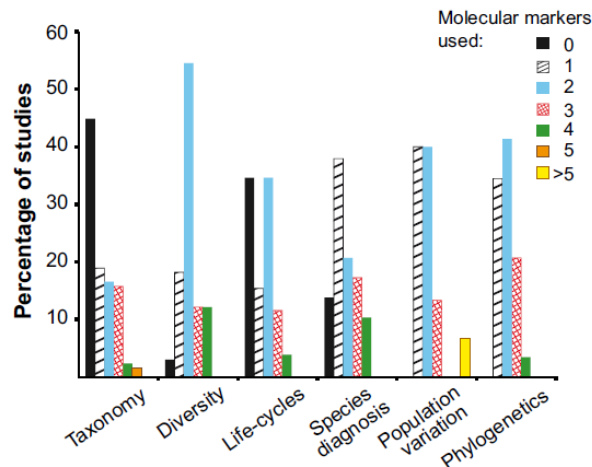


Figura 7: Porcentagem de estudos de taxonomia, diversidade, ciclo biológico, variação populacional, diagnóstico específico e filogenia de trematódeos utilizando marcadores moleculares.

Fonte: Blasco-Costa et al., 2016b

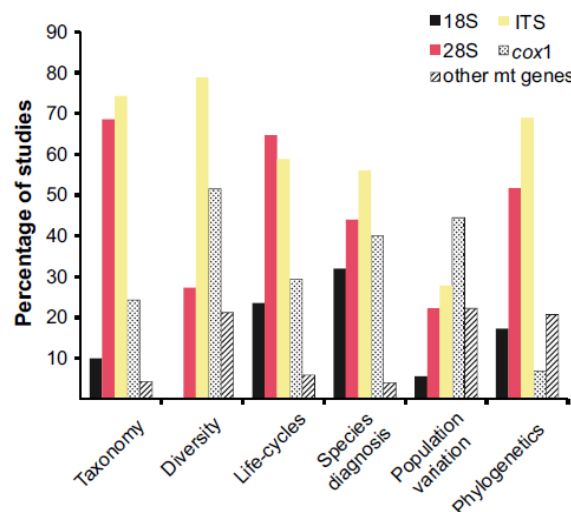


Figura 8: Porcentagem de estudos de taxonomia, diversidade, ciclo biológico, variação populacional, diagnóstico específico e filogenia de trematódeos usando cada um dos marcadores moleculares mais comuns: 18S, ITS, 28S, COI ou outros genes.

Fonte: Blasco-Costa et al., 2016b

Para a utilização na taxonomia molecular, filogenia e para fins diagnósticos, se faz necessário o estudo criterioso para a definição do marcador molecular mais adequado, ou seja, que apresente uma variação intraespecífica relativamente baixa e um alto nível de divergência entre espécies. Os genes do mtDNA, como o COI, apresentam maior divergência nas sequências entre espécies, sendo considerados como marcadores de evolução rápida, ideais

para a identificação de polimorfismos entre espécies ou até mesmo para detecção de variações intraespecíficas. Já as regiões ITS1 e ITS2 do rDNA acumulam substituições de forma mais lenta do que os genes do mtDNA, sendo por isso considerado como marcadores de evolução lenta, ideais para a identificação de polimorfismos entre famílias. Estudos realizados por Vilas e colaboradores (2005) sugerem que, levando em consideração a quantidade de substituições e a variabilidade entre sequências, o gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade I (NDI) apresenta um maior grau de variabilidade seguido por COI, ITS1 e ITS2, sendo esta última, a região mais conservada. Dados de Moszczyńska e colaboradores (2009) corroboram com essa afirmativa, uma vez que a taxa de divergência encontrada entre as sequências de COI obtidas a partir de amostras de trematódeos foi de 15%, enquanto as sequências de ITS apresentaram uma taxa de divergência de 3,9%. O conhecimento dessas variáveis é de extrema importância para a escolha do marcador molecular e o método mais adequado a ser utilizado para taxonomia e diagnóstico dos trematódeos.

É importante ressaltar que o uso de ferramentas moleculares e os estudos utilizando marcadores moleculares surgem como um suporte para a taxonomia clássica e não em substituição a ela, uma vez que são capazes de elucidar dúvidas importantes. A correta identificação de trematódeos é de extrema relevância tanto para fins taxonômicos, quanto para fins diagnósticos. Além disso, uma correta identificação dos trematódeos proporciona maior conhecimento da biodiversidade, distribuição e ecologia desse grupo (MOSZCZYNSKA et al., 2009). A grande diversidade desses organismos é, muitas vezes, desconhecida devido à falta de taxonomistas especialistas no grupo (PINTO; MELO, 2015). Portanto, a correta identificação tanto do hospedeiro intermediário, quanto do trematódeo, é de indiscutível importância para o conhecimento das áreas de transmissão e a implementação de medidas de controle adequadas contra as doenças parasitárias transmitidas pelos moluscos.

3 Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM)

A Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM) foi fundada em 1993 e atualmente está localizada no Instituto René Rachou (IRR). Em 2011, através da portaria 526/2011, a Fiocruz-CMM foi institucionalizada. No IRR, a Fiocruz-CMM está localizada no Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica (LHMM), que, em 2003, foi reconhecido como Serviço de Referência Nacional em Esquistossomose (SNRE) (portaria 162/2003). O SNRE realiza exame e identificação de moluscos do gênero *Biomphalaria* provenientes de diversos

centros de serviços de saúde do Brasil. Os dados gerados pelo serviço são utilizados pela Gerência do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS) para o delineamento de ações de controle da esquistossomose.

Atualmente a coleção é composta por um acervo de mais de 15.000 moluscos límnicos de importância médica e veterinária, principalmente do gênero *Biomphalaria*. Estes moluscos são provenientes de diversas localidades do Brasil e de países das Américas e Europa. Quando recebidos pelo SNRE, os moluscos do gênero *Biomphalaria* são encaminhados ao Moluscário Lobato Paraense onde são examinados (conforme estabelecido por Souza e Lima, 1997) para verificação de infecção por trematódeos. Caso haja infecção, as larvas dos trematódeos liberadas pelo molusco são identificadas quanto ao tipo cercariano e encaminhadas em *pool* para o LHMM, onde o molusco e as cercarias por ele liberadas serão fixados. As cercarias de *Schistosoma mansoni* são identificadas em nível de espécie e sua presença é reportada ao órgão responsável pelo envio do molusco. Em caso de recebimento de moluscos pertencentes a outros gêneros de importância médica ou veterinária, estes são encaminhados diretamente ao LHMM e, quando de interesse do mesmo, inseridos no acervo da Fiocruz-CMM.

Toda informação associada ao exemplar obtida no momento da coleta (como data, local de coleta com coordenada geográfica, nome do coletor, outras observações) assim como o resultado do exame para infecção por trematódeos, dados taxonômicos e o responsável pela identificação realizada pelo SNRE, são armazenadas em um Livro Tombo (disponível em Excel no sistema interno) e online na página do Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA), na rede SpeciesLink (<http://splink.cria.org.br/>).

Em 2012, Aguiar-Silva realizou uma retificação da identificação de todos os moluscos do gênero *Biomphalaria* presentes na Fiocruz-CMM, utilizando a taxonomia clássica integrada a técnicas moleculares (PCR-RFLP). Em 2014(a), Carvalho realizou a retificação da identificação de todos os moluscos da família Lymnaeidae através de técnicas morfológicas. Atualmente, moluscos do gênero *Physa* e *Drepanotrema* estão sendo minuciosamente estudados através de análises morfológicas e moleculares. Os representantes dos outros moluscos límnicos depositados na CMM estão identificados até o gênero devido à falta de especialistas para realizar a identificação específica. As larvas de trematódeos liberadas por moluscos do gênero *Biomphalaria* ainda não foram reavaliadas quanto a sua identificação. Apenas cercarias de *Schistosoma mansoni* estão identificadas em nível de espécie. As demais cercarias estão separadas e classificadas por tipo cercariano, ou não estão identificadas, devido a ausência de especialistas para realizar a identificação.

JUSTIFICATIVA

A identificação taxonômica de trematódeos a partir do seu estágio larval é um grande desafio para a sistemática desse grupo. As cercarias são organismos muito pequenos, que exigem uma manipulação cuidadosa e cuja análise morfológica deve ser feita por um profissional experiente e capacitado. Ainda assim, não é possível avançar muito durante a identificação. Além disso, a identificação taxonômica das larvas pode ser confusa, levando a diagnósticos incorretos, principalmente falsos positivos ou negativos para *S. mansoni*. Sendo assim, para uma correta e segura identificação específica, é necessário que se complete seu ciclo de vida de forma experimental, a fim de utilizar então o parasito adulto para a identificação taxonômica. Dessa forma, os métodos moleculares tornam-se grandes aliados à taxonomia clássica.

A escassez de dados genômicos depositados no banco de dados online National Center for Biotechnology Information (NCBI- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para a maioria dos trematódeos reflete a necessidade de maiores estudos nessa área. São apenas 13 genomas nucleares e 28 mitocondriais (dados de dez/2017). Sabendo da importância dos trematódeos na saúde humana e animal, além do impacto gerado na economia (sobretudo na piscicultura), torna-se cada vez mais relevante o estudo de marcadores moleculares capazes de auxiliar na correta identificação e diagnóstico desses parasitos em qualquer estágio do seu ciclo de vida.

A identificação molecular em nível de família proposto nesse estudo é um passo importante uma vez que permite confirmar a identificação feita através da taxonomia clássica, fornece informações importantes sobre a diversidade e distribuição de trematódeos, direciona para os possíveis hospedeiros definitivos e por fim, possibilita o delineamento de melhores e mais adequadas estratégias de controle. A partir de dados gerados nesse estudo, posteriormente, novos marcadores moleculares em nível de gênero e espécies dentro de cada família poderão ser identificados.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Definir marcadores moleculares para identificação, diferenciação e filogenia de famílias de trematódeos que parasitam moluscos do gênero *Biomphalaria*.

Objetivos Específicos

- Identificar morfológica e morfometricamente as larvas de trematódeos liberadas por moluscos depositados na Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM).
- Obter um painel de iniciadores família-específicos para as famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae.
- Padronizar a PCR-Multiplex para a sua utilização na identificação e diferenciação das famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae.
- Inferir as relações filogenéticas entre as famílias estudadas a partir de sequências obtidas neste estudo.

1 Amostras utilizadas

A seleção das amostras utilizadas neste estudo foi feita a partir do rastreamento do Livro de Tombo da Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM). Foram selecionadas 85 amostras de cercarias (Tabela 1) e 108 amostras de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados com cercarias (Tabela 2). Para a escolha dos moluscos, foram priorizados aqueles cujas cercarias por eles eliminadas não se encontravam entre as 85 amostras de cercarias selecionadas.

O recebimento, exame, fixação e identificação dos moluscos do gênero *Biomphalaria* utilizados foram realizados previamente pelo Serviço de Referência Nacional em Esquistossomose da Fiocruz.

Foram utilizadas também amostras de cercarias cedidas pelo Laboratório de Biologia de Trematódeos (Parasitologia/ICB/UFMG) como controle e para a validação do estudo.

Tabela 1- Amostras de cercarias utilizadas nesse estudo descritas conforme sua identificação no Livro de Tombo da Coleção de Malacologia Médica (FIOCRUZ-CMM).

Código da Amostra (Fiocruz-CMM)	Identificação da Amostra (Moluscário Lobato Paraense)	Identificação do Hospedeiro Intermediário (Serviço Nacional de Referência em Esquistossomose)	Localidade da Coleta	Data da Coleta
8164	Ocelífera	<i>B. tenagophila</i>	Sabará/MG	14/04/2005
14289	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/ MG	24/06/2013
14290	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/ MG	24/06/2013
14301	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/ MG	03/07/2013
14303	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/ MG	2013
14532	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	<i>B. straminea</i>	Berilo/MG	18/07/2013
14558	Sem cauda bifurcada	<i>B. peregrina</i>	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14560	Sem cauda bifurcada	<i>B. peregrina</i>	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14562	Sem cauda bifurcada	<i>B. peregrina</i>	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14569	Sem cauda bifurcada	<i>B. peregrina</i>	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14575	Sem cauda bifurcada	<i>B. peregrina</i>	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14577	Com cauda bifurcada	<i>B. peregrina</i>	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14655	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Aricanduva/MG	26/07/2013
14700	Com cauda bifurcada	N/I	Itamarandiba/MG	30/07/2013
14702	Sem cauda bifurcada	N/I	Itamarandiba/MG	30/07/2013
14762	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Materlandia/MG	01/08/2013

14806	Sem cauda bifurcada	<i>B. straminea</i>	Ponto dos Volantes/MG	2013
14820	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	<i>B. occidentalis</i>	Campo Grande/MS	13/08/2013
15067	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Santo Antônio do Jacinto/MG	2013
15069	Sem cauda bifurcada	<i>B. straminea</i>	Santa Maria do Salto/MG	2013
15071	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	<i>B. straminea</i>	Santa Maria do Salto/MG	2013
15087	Sem cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Rubim/MG	2013
15089	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Rubim/MG	2013
15091	Cercaria	<i>B. glabrata</i>	Rubim/MG	2013
15160	Macrogranulosa	<i>B. straminea</i>	Almenara/MG	07/10/2013
15162	Caratinguensis	<i>B. straminea</i>	Almenara/MG	07/10/2013
15164	Macrogranulosa	<i>B. glabrata</i>	Jordânia/MG	07/10/2013
15167	Cercaria	<i>B. glabrata</i>	Mata Verde/MG	07/10/2013
15169	Ocelífera	<i>B. straminea</i>	Almenara/MG	07/10/2013
15171	Macrogranulosa	<i>B. straminea</i>	Almenara/MG	07/10/2013
15244	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Rio do Prado/MG	2013
15246	Sem cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Rio do Prado/MG	2013
15248	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Rio do Prado/MG	2013
15275	Cercaria	<i>B. glabrata</i>	Monte Formosa/MG	2013
15277	Cercaria	<i>B. glabrata</i>	Monte Formosa/MG	2013
15474	Com cauda bifurcada	<i>B. schrammi</i>	Crisólita/MG	2013
15588	Sem cauda bifurcada	<i>B. straminea</i>	Itaocara/RJ	03/05/2013
16442	Com cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/MG	16/03/2015
16443	Com cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/MG	16/03/2015
16494	Com cauda bifurcada	<i>B. straminea</i>	Bugre/MG	26/03/2015
16495	Com cauda bifurcada	<i>B. straminea</i>	Ribeirão das Neves/MG	30/03/2015
16496	Com cauda bifurcada	<i>B. straminea</i>	Ribeirão das Neves/MG	30/03/2015
16497	Com cauda bifurcada	<i>B. straminea</i>	Ribeirão das Neves/MG	30/03/2015
16498	Com cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/MG	30/03/2015
16499	Com cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/MG	30/03/2015
16599	Cercaria	<i>B. glabrata</i>	Malacacheta/MG	07/04/2015
16600	Cercaria	<i>B. glabrata</i>	Malacacheta/MG	07/04/2015
16737	Sem cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/ MG	04/05/2015
16738	Sem cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Ribeirão das Neves/MG	04/05/2015
16757	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Santana do Riacho/MG	06/05/2015
16758	Com cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Santana do Riacho/MG	06/05/2015
16759	Com cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Santana do Riacho/MG	06/05/2015
16760	Com cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Santana do Riacho/MG	07/05/2015
16761	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Santana do Riacho/MG	07/05/2015
16805	Sem cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Mariana/MG	13/07/2015
16949	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Mariana/MG	13/07/2015
16950	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Belo Horizonte/MG	25/09/2015
17056	Sem cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Belo Horizonte/MG	25/09/2015

17058	Sem cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Santana do Riacho/MG	28/10/2015
17070	Com cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Santana do Riacho/MG	28/10/2015
17071	Com cauda bifurcada	<i>B. tenagophila</i>	Cabo Frio/MG	01/12/2015
17102	Com cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Belo Horizonte/MG	2016
17229	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Belo Horizonte/MG	2016
17231	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. straminea</i>	Betim/MG	19/04/2016
17266	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. straminea</i>	Betim/MG	19/04/2016
17268	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Betim/MG	19/04/2016
17270	Caratinguensis	<i>B. glabrata</i>	Betim/MG	19/04/2016
17272	Caratinguensis	<i>B. glabrata</i>	Betim/MG	19/04/2016
17274	Macrogranulosa	<i>B. glabrata</i>	Betim/MG	19/04/2016
17276	Macrogranulosa	<i>B. straminea</i>	Belo Horizonte/MG	03/05/2016
17278	Macrogranulosa	<i>B. straminea</i>	Ribeirão das Neves/MG	30/06/2016
17447	Cercaria	<i>B. straminea</i>	Ribeirão das Neves/MG	30/06/2016
17449	Sem cauda bifurcada	<i>B. glabrata</i>	Serrano do Maranhão/MA	05/07/2016
17494	Cercaria	<i>B. glabrata</i>	Serrano do Maranhão/MA	05/07/2016
17496	Cercaria	<i>B. glabrata</i>	Serrano do Maranhão/MA	05/07/2016
17497	Caratinguensis	<i>B. straminea</i>	Betim/MG	01/09/2016
17595	Sem cauda bifurcada	<i>B. tenagophila</i>	Betim/MG	01/09/2016
17597	Sem cauda bifurcada	<i>B. tenagophila</i>	Betim/MG	01/09/2016
17599	Com cauda bifurcada	<i>B. tenagophila</i>	Betim/MG	01/09/2016
17601	Sem cauda bifurcada	<i>B. tenagophila</i>	Betim/MG	01/09/2016
17650	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>B. glabrata</i>	Ouro Preto/MG	07/10/2016
17947	Com cauda bifurcada	<i>B. straminea</i>	Uberlândia/MG	02/08/2017
18040	Sem cauda bifurcada	<i>B. kuhniana</i>	Taquaraçu de Minas/MG	19/09/2017
18042	Sem cauda bifurcada	<i>B. kuhniana</i>	Taquaraçu de Minas/MG	19/09/2017
18044	Sem cauda bifurcada	<i>B. kuhniana</i>	Taquaraçu de Minas/MG	19/09/2017

N/I : não identificado

Tabela 2- Amostras de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados com larvas de trematódeos utilizados neste estudo.

Código da Amostra (Fiocruz-CMM)	Identificação da Amostra (Serviço Nacional de Referência em Esquistossomose)	Identificação do Trematódeo (Moluscário Lobato Paraense- Fiocruz)	Localidade da Coleta	Data da Coleta
11987	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Sabará/MG	03/05/2011
11988	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Sabará/MG	03/05/2011
12180	<i>Biomphalaria peregrina</i>	N/I	Prados/MG	25/08/2011
12277	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ouro Preto/MG	29/09/2011
12278	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ouro Preto/MG	29/09/2011
12279	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ouro Preto/MG	29/09/2011
12280	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ouro Preto/MG	29/09/2011
12321	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Ribeirão das Neves/MG	08/11/2011
12348	<i>Biomphalaria sp.</i>	Macrogranulosa	Jucurutu/RN	28/11/2011

12349	<i>Biomphalaria</i> sp.	Macrogranulosa	Jucurutu/RN	28/11/2011
12378	<i>Biomphalaria</i> sp.	Macrogranulosa	Curitiba/PR	30/11/2011
12379	<i>Biomphalaria</i> sp.	Macrogranulosa	Curitiba/PR	30/11/2011
12380	<i>Biomphalaria</i> sp.	Caratinguensis	Curitiba/PR	30/11/2011
12413	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Caratinguensis	Jaboticatubas/MG	12/03/2012
12414	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Caratinguensis	Jaboticatubas/MG	12/03/2012
12417	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Jaboticatubas/MG	12/03/2012
12419	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Jaboticatubas/MG	12/03/2012
12420	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Caratinguensis	Jaboticatubas/MG	12/03/2012
12422	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Caratinguensis	Jaboticatubas/MG	12/03/2012
12428	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Macrogranulosa	Jaboticatubas/MG	13/03/2012
12430	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Macrogranulosa	Jaboticatubas/MG	13/03/2012
12431	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Jaboticatubas/MG	13/03/2012
12432	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Jaboticatubas/MG	13/03/2012
12463	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Ribeirão das Neves/MG	26/04/2012
12464	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Ribeirão das Neves/MG	26/04/2012
12692	<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ponto dos Volantes/MG	16/10/2012
12693	<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ponto dos Volantes/MG	16/10/2012
12701	<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ponto dos Volantes/MG	16/10/2012
12702	<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ponto dos Volantes/MG	16/10/2012
12725	<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ponto dos Volantes/MG	16/10/2012
12732	<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ponto dos Volantes/MG	16/10/2012
12733	<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ponto dos Volantes/MG	16/10/2012
12791	<i>Biomphalaria</i> sp.	Macrogranulosa	Rio Espera/MG	18/10/2012
12793	<i>Biomphalaria</i> sp.	Caratinguensis	Rio Espera/MG	18/10/2012
12794	<i>Biomphalaria</i> sp.	Caratinguensis	Rio Espera/MG	18/10/2012
12797	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Lamim/MG	18/10/2012
12798	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Lamim/MG	18/10/2012
12799	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Lamim/MG	18/10/2012
12883	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Itaverava/MG	2012
12884	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Itaverava/MG	2012
12887	<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>Schistosoma mansoni</i>	Itaverava/MG	2012
12964	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Ibertioga/MG	2012
12965	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Ibertioga/MG	2012
12978	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Paiva/MG	2012
12980	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Paiva/MG	2012
13571	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013
13573	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013
13574	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013
13576	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013
13627	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013
13628	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013
13629	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013
13631	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013
13633	<i>Biomphalaria</i> sp.	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013

13635	<i>Biomphalaria sp.</i>	N/I	Belo Horizonte/MG	14/01/2013
13884	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Santana dos Montes/MG	2013
13885	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Santana dos Montes/MG	2013
13892	<i>Biomphalaria peregrina</i>	N/I	Desterro do Melo/MG	2013
13894	<i>Biomphalaria peregrina</i>	N/I	Desterro do Melo/MG	2013
14379	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Francisco do Badaró/MG	05/07/2013
14380	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Francisco do Badaró/MG	05/07/2013
14533	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Berilo/MG	16/07/2013
14557	<i>Biomphalaria peregrina</i>	N/I	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14559	<i>Biomphalaria peregrina</i>	N/I	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14561	<i>Biomphalaria peregrina</i>	N/I	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14574	<i>Biomphalaria peregrina</i>	N/I	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14576	<i>Biomphalaria peregrina</i>	N/I	Passa Tempo/MG	16/07/2013
14654	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Aricanduva/MG	26/07/2013
14699	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Itamarandiba/MG	30/07/2013
14701	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Itamarandiba/MG	30/07/2013
14761	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Materlândia/MG	01/08/2013
14805	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Ponto dos Volantes/MG	2013
14817	<i>Biomphalaria sp.</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Campo Grande/MS	13/08/2013
14818	<i>Biomphalaria sp.</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Campo Grande/MS	13/08/2013
15066	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Santo Antônio do Jacinto/MG	2013
15068	<i>Biomphalaria straminea</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Santa Maria do Salto/MG	2013
15070	<i>Biomphalaria straminea</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Santa Maria do Salto/MG	2013
15086	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Rubim/MG	2013
15088	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Cercaria com cauda bifurcada, não é de <i>S. mansoni</i>	Rubim/MG	2013
15090	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Rubim/MG	2013
15159	<i>Biomphalaria straminea</i>	Macrogranulosa	Almenara/MG	07/10/2013
15161	<i>Biomphalaria straminea</i>	Caratinguensos	Almenara/MG	07/10/2013
15163	<i>Biomphalaria sp.</i>	Macrogranulosa	Jordania/MG	07/10/2013
15166	<i>Biomphalaria sp.</i>	N/I	Mata Verde/MG	07/10/2013
15170	<i>Biomphalaria straminea</i>	Macrogranulosa	Almenara/MG	07/10/2013
15243	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Cercaria com cauda bifurcada, não é de <i>S. mansoni</i>	Rio do Prado/MG	2013
15245	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Rio do Prado/MG	2013
15247	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Cercaria com cauda bifurcada, não é de <i>S. mansoni</i>	Rio do Prado/MG	2013
15274	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Monte Formosa/MG	2013
15276	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Monte Formosa/MG	2013
15473	<i>Biomphalaria schrammi</i>	Cercaria com cauda não	Crisolita/MG	2013

		bifurcada			
15569	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Nanuque/MG		2013
15570	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Nanuque/MG		2013
15571	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Nanuque/MG		2013
15902	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Sabará/MG		25/06/2014
15903	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Cercaria com cauda não bifurcada	Sabará/MG		25/06/2014
16765	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Santana do Riacho/MG		06/05/2015
16947	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Mariana/MG		13/07/2015
17265	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Betim/MG		19/04/2016
17267	<i>Biomphalaria straminea</i>	N/I	Betim/MG		19/04/2016
17649	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Ouro Preto/MG		07/10/2016
17665	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Ouro Preto/MG		07/10/2016
17666	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Ouro Preto/MG		07/10/2016
17667	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Ouro Preto/MG		07/10/2016
17668	<i>Biomphalaria glabrata</i>	N/I	Ouro Preto/MG		07/10/2016
18041	Ainda não identificado	Cercaria com cauda não bifurcada	Taquaraçu de Minas/MG		19/09/2017
18043	Ainda não identificado	Cercaria com cauda não bifurcada	Taquaraçu de Minas/MG		19/09/2017
18045	Ainda não identificado	Cercaria com cauda não bifurcada	Taquaraçu de Minas/MG		19/09/2017

N/I : não identificado

2 Obtenção do Material Biologico

Apos a chegada  Fiocruz, os moluscos são encaminhados para o Moluscário Lobato Paraense onde são examinados para a infecção por trematodeos. O exame parasitologico de moluscos ocorre mediante exposição à luz artificial. Eles são separados em recipientes com 4mL de água desclorada de acordo com o ponto de coleta e expostos à luz por 45 minutos a uma distância entre o foco de luz e o recipiente de 30 cm e temperatura de 27C. Apos o tempo de exposição,  realizada uma análise através de microscópio estereoscópico para observar a presença de cercarias. As cercarias (quando presentes) e os moluscos (infectados e não infectados) são, então encaminhados ao LHMM onde os moluscos são fixados (PARAENSE, 1976- adaptado), separados em três partes: concha (armazenada em via seca, em algodão), corpo (armazenado em via úmida, com fixador a base de formol) e fragmento da região cefalopodal (armazenado em tubos de polietileno e criopreservado a -70C). As três partes de um mesmo exemplar recebem uma codificação única e sequencial, dada pela Fiocruz-CMM ao integrar seu acervo. A identificação específica dos moluscos do gênero *Biomphalaria*  feita a partir de técnicas morfológicas baseadas nos estudos de Paraense

(1966a, 1966b, 1975, 1981, 1984, 1988, 1990 e 1996), Deslandes (1951), Paraense e Deslandes (1957, 1958a, 1958b) e Estrada et al. (2005), e moleculares conforme os estudos de Caldeira et al. (1998 e 2000), Spatz et al. (1998, 1999 e 2000) e Vidigal *et al* (1998a, 1998b, 2000 e 2001). Quando detectada a infecção por trematódeos no Moluscário Lobato Paranse, as cercarias são encaminhadas em *pool* ao LHMM onde, após centrifugação em baixa rotação, são divididas em dois tubos de polietileno: um tubo contendo fixador AFA (álcool-formalina-ácido acético) para utilização em estudos morfológicos e morfométricos, que será armazenado em temperatura ambiente; e outro tubo que será criopreservado a -70°C para estudos moleculares. As cercarias são identificadas quanto ao seu tipo cercariano, exceto *S. mansoni* que é identificada a nível específico.

3 Análises Morfológicas e Morfométricas das Cercarias

Para as análises taxonômicas, as larvas de trematódeos preservadas em AFA foram coletadas com o auxílio de micropipeta para preparação de lâminas não permanentes e sem coloração. As lâminas foram observadas em microscópio óptico e as medidas foram obtidas com auxílio de ocular micrometrada. Para cada tubo contendo um *pool* de cercarias, foi mensurado o máximo de exemplares possível. A presença e/ou ausência de caracteres morfológicos, além dos valores encontrados pela morfometria, foram comparados com dados encontrados na literatura (PINTO, 2013; RUIZ, 1952, 1953).

4 Obtenção das Sequências Nucleotídicas em Banco de Dados Públicos

Utilizando a plataforma NCBI, foi feito um levantamento dos genomas nucleares e mitocondriais, além de genes completos ou regiões sequenciadas para as famílias de trematódeos abordadas neste estudo. Dessa forma, foram selecionadas sequências do DNA ribossomal (rDNA) de trematódeos das famílias Clinostomidae, Echinostomidae, Schistosomatidae e Strigeidae, principais famílias já relatadas em *Biomphalaria* na região neotropical. As sequências selecionadas estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3- Sequências de rDNA de espécies de trematódeos pertencentes a famílias já relatadas em *Biomphalaria spp.* utilizadas para o desenho de iniciadores.

Família	Espécie	Número de acesso- NCBI
Clinostomidae	<i>Clinostomoides brieni</i>	KF811007.1
	<i>Clinostomum complanatum</i>	FJ609420.1
	<i>Clinostomum cutaneum</i>	GQ339114.1
	<i>Clinostomum marginatum</i>	KJ477679.1
	<i>Clinostomum phalacrocoracis</i>	FJ609423.1
	<i>Clinostomum tataxumui</i>	KJ477675.1
	<i>Euclinostomum heterostomum</i>	KP721437.1
	<i>Euclinostomum sp.</i>	KC894799.1
Echinostomatidae	<i>Drepanocephalus auritus</i>	KP053260.1
	<i>Echinoparyphium recurvatum</i>	KJ435282.1
	<i>Echinostoma friedi</i>	AJ564383.1
	<i>Echinostoma paraensei</i>	U58100.1
	<i>Echinostoma revolutum</i>	U58102.1
	<i>Echinostoma trivolvis</i>	U58097.1
	<i>Hypoderaeum conoideum</i>	AJ564385.1
	<i>Isthmiophora melis</i>	AY168932.1
Schistosomatidae	<i>Bilharziella polonica</i>	EF094539.1
	<i>Schistosoma turkenstanicum</i>	HM803240.1
	<i>Schistosoma bovis</i>	FJ588862.1
	<i>Schistosoma mansoni</i>	KX011042.1
	<i>Trichobilharzia franki</i>	KP271013.1
	<i>Trichobilharzia physellae</i>	FJ174575.1
	<i>Trichobilharzia querquedulae</i>	FJ174560.1
	<i>Trichobilharzia regenti</i>	KP271015.1
	<i>Trichobilharzia szidati</i>	KP271014.1
	<i>Apatemon sp.</i>	HM064916.1
	<i>Apharyngostrigea cornu</i>	HM064969.1
	<i>Australapatemon burti</i>	JX977786.1
Strigeidae	<i>Australapatemon niewiadomski</i>	KT334173.1
	<i>Ichthyocotylurus pileatus</i>	HM064929.1
	<i>Parastrigea cincta</i>	JX977820.1
	<i>Parastrigea diovađen</i>	JX977815.1
	<i>Parastrigea plataleae</i>	JX977836.1

5 Desenho dos Iniciadores

O desenho dos iniciadores foi feito utilizando a ferramenta online TipMT (RODRIGUES-LUIZ et al., 2017). Como *input* foram utilizadas as sequências descritas na

tabela 3, em formato fasta. Foram aceitos iniciadores com tamanho inicial do *amplicon* de 100pb e diferença de, no mínimo, 10pb entre cada fragmento amplificado. O grau de estringência aceito foi de cinco *mismatches* e *gaps*. A ferramenta TipMT identificou a região alvo e, utilizando o primer3 (UNTERGASSER et al., 2012), desenhou os iniciadores a partir das especificações padrão de tamanho de 20 nucleotídeos e de temperatura de anelamento (TM) de 60°C. Os iniciadores gerados foram então classificados em categorias sendo que, para este objetivo, os iniciadores selecionados foram aqueles conservados entre espécies da mesma família (ou seja, deverá haver amplificação em todas as sequências alvo com o mesmo tamanho de fragmento) e específico para cada uma das diferentes famílias (ou seja, gerar fragmentos apenas para cada família para o qual foi desenhado e com tamanhos diferentes dos *amplicons* gerados com os outros iniciadores nas demais famílias). Posteriormente foi feita uma análise de compatibilidade dos iniciadores selecionados para uma reação de PCR multiplex através da ferramenta e-PCR (SCHULER, 1997), a fim de visualizar possíveis interações entre diferentes iniciadores. Os pares de iniciadores gerados pelo TipMT foram então submetidos ao PRIMER-BLAST (YE et al., 2012) no NCBI com todas as espécies de trematódeos e de *Biomphalaria*, a fim de identificar possíveis ampliações inespecíficas.

6 Padronização das técnicas moleculares

6.1 Extração do DNA total

6.1.1 Cercarias

O DNA total das amostras de cercarias criopreservadas foi utilizado para as análises moleculares e foi isolado utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Em um tubo de polietileno contendo um *pool* de cercarias, foi adicionado 180µl do tampão ATL e 20µl de proteinase K seguido por agitação no vortex e incubação a 56°C por 4 horas. Ao longo do deste período, os tubos foram ocasionalmente agitados no vortex. Ao final da incubação, os tubos foram agitados no vortex por 15 segundos. Em seguida, 200µl do tampão AL foram adicionados e, novamente, os tubos foram agitados no vortex. 200µl de etanol absoluto foram adicionados aos tubos que foram mais uma vez agitados no vortex. A solução foi então transferida para colunas fornecidas pelo fabricante e centrifugadas a 6.000g por 1 minuto. O tubo foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo onde 500µl do tampão AW1

foram adicionados para posterior centrifugação por 1 minuto a 6.000g. O tubo foi novamente descartado e a coluna transferida para um novo tubo onde 500µl do tampão AW2 foram adicionados para posterior centrifugação a 20.000g por 3 minutos. O tubo foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo onde 100µl do tampão AE foram adicionados diretamente na membrana da coluna. Os tubos foram então incubados a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugados por 1 minuto a 6.000g. As colunas foram descartadas e as amostras extraídas, dosadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop, diluídas para uma concentração de 10ng/µl e armazenadas em freezer a -20°C.

6.1.2 Fragmento de Molusco Infectado

Um fragmento de tecido dos moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados foi utilizado para a extração do DNA total utilizando o kit Wizard Genomic Purification (Promega). Em um tubo de polietileno contendo o fragmento de tecido, foi adicionado 200µl de solução de lise nuclear e 1µl de proteinase K (20µg/ml). Após incubação a 37°C *overnight*, foram adicionados 80µl de solução de precipitação proteica ao tubo seguido de agitação no vortex por 20 segundos e centrifugação a 15.000g por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo previamente etiquetado contendo 200µl de isopropanol, homogeneizado por 20 minutos e centrifugado a 15.000g por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se então 500µl de etanol 100% gelado com 10µl de solução de acetato de sódio 3M pH 5,2 para incubação a -70°C por 2 horas. Após essa etapa, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 15.000g e o sobrenadante, descartado. 500µl de etanol 70% gelado foram adicionados seguidos por centrifugação por 10 minutos, sendo o sobrenadante novamente descartado. O *pellet* formado no fundo do tubo foi reidratado com 25µl de solução de reidratação (10mM Tris 1mM EDTA) por 45 minutos a 37°C. As amostras extraídas foram dosadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop, diluídas para 10ng/µl e armazenadas em freezer a -20°C.

6.2 Reação em Cadeira da Polimerase (PCR)

Foram utilizadas como controles amostras de *Clinostomum complanatum* (família Clinostomidae), *Drepanocephalus auritus* (família Echinostomatidae), *Schistosoma mansoni* (família Schistosomatidae), família Strigeidae, *Austrodiplostomum* sp. (família Diplostomidae), família Spirorchiiidae, *Cercaria lutzii* (tipo cercariano Xifidiocercária, prováveis famílias: Eumegacetidae, Haplometridae, Lecithodendridae, Macroderoiidae,

Plagiorchiidae ou Reniferidae), cercaria do tipo monostoma (prováveis famílias: Notocotylidae ou Pronocephalidae) (cedidas pelo Dr. Hudson Alves Pinto- Laboratório de Biologia de Trematódeos, Parasitologia/ICB/UFMG) e de *Fasciola hepatica*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. penegrina*, *B. oligoza*, *B. occidentalis*, *B. schrammi*, *B. cousini*, *B. amazonica* e *B. kuhniiana* (cedidas pela Fiocruz-CMM). O DNA genômico destas amostras foi utilizado como molde para a PCR direcionada para a região ITS do rDNA, utilizando os iniciadores desenhados neste estudo para as famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae. O volume total da reação foi de 10ul contendo: 0,06U/ μ l de *Taq* DNA Polimerase (Phoneutria), 0,5uM/ μ l de cada iniciador, 0,2mM/ μ l de dNTPs (Biorad), Tampão goTaq 1x (Promega), 10ng de DNA e água ultrapura até completar o volume total. A reação foi submetida ao termociclador sob as seguintes condições: 5min a 94°C para desnaturação, seguido por 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 62,5°C e 30s a 72°C, e extensão final a 72°C por 7min. O resultado foi visualizado em gel de agarose 2% corado por brometo de etídio.

6.2.1 Teste de especificidade

Para avaliar a especificidade da reação de PCR utilizando os iniciadores selecionados foram utilizadas preparações de DNA genômico extraídas e diluídas para a concentração de 10ng/ μ l das seguintes amostras: Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae, Strigeidae, Diplostomidae, Spirorchiidae, *Cercaria lutzi*, cercaria do tipo monostoma, *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835), *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981, *B. straminea*, *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864).

6.2.2 Teste de sensibilidade

Para avaliar a sensibilidade da reação de PCR utilizando os iniciadores selecionados foram preparadas diluições seriadas do DNA genômico de amostras das famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidar de 10ng a 1fg.

6.2.3 Teste de coinfeção simulada

Para avaliar a capacidade dos iniciadores para detectar o DNA alvo de cada família em uma situação de coinfeção foi preparado um *pool* contendo 10ng de DNA de cada representante das quatro famílias (*C. complanatum*, *D. auritus*, *S. manoni* e Strigeidae), que foi utilizado como molde para a reação de PCR com cada par de iniciadores selecionados.

6.2.4 Teste de sensibilidade da coinfeção simulada

Para avaliar a sensibilidade da reação de PCR utilizando cada par de iniciadores na detecção de coinfeção foram preparadas diluições seriadas do *pool* de DNA das quatro famílias de 10ng a 1fg, que foram utilizadas como molde para a reação de PCR com cada par de iniciadores selecionados.

6.2.5 Teste de detecção da infecção por *S. mansoni* em amostras de *Biomphalaria* spp.

Para avaliar a capacidade do iniciador desenhado para a família Schistosomatidae na detecção da infecção por *S. mansoni*, amostras coletadas em campo e criopreservadas na Fiocruz-CMM de moluscos *Biomphalaria* positivos foram utilizados como molde para a reação de PCR.

6.3 PCR Multiplex

As amostras controles descritas no tópico acima (6.2) foram utilizadas como molde para a PCR multiplex, contendo um par de iniciadores específico para cada uma das famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae, desenhados neste estudo e padronizados pela PCR convencional. O volume total da reação foi de 20µl contendo: 0,06U/µl de *Taq* DNA Polimerase (Phoneutria), 0,25µM/ul de cada iniciador, 0,2mM/ul de dNTPs (Biorad), tampão goTaq 1x (Promega), 50ng de DNA de cada amostra e água ultrapura até completar o volume total. A reação foi submetida ao termociclador sob as

seguintes condições: 5min a 94°C para desnaturação, seguido por 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 62,5°C e 30s a 72°C, e extensão final a 72°C por 7min. O resultado foi visualizado em géis de agarose 3% corado com brometo de etídio.

6.3.1 Teste de especificidade

Para avaliar a especificidade da reação de PCR multiplex, utilizou-se como molde para a reação amostras das quatro famílias-alvo (Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae, e Strigeidae), de trematódeos de outras famílias (Diplostomidae, Spirorchiidae, Fasciolidae, *Cercaria lutzi* e cercaria do tipo monostoma), de um nematódeo (*Angiostrongylus cantonensis*), de espécies de *Biomphalaria* encontradas no Brasil (*Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. penegrina*, *B. oligoza*, *B. occidentalis*, *B. schrammi*, *B. cousini*, *B. amazonica*, *B. kuhniana*) e de espécimes de *Biomphalaria* coletadas em campo e parasitadas com trematódeos.

6.3.2 Teste de coinfeção simulada

Para avaliar a capacidade da reação de PCR multiplex na detecção da coinfeção, foram feitas *pools* utilizando 50ng de DNA das famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae em preparações simulando todas as combinações possíveis de coinfeção entre elas.

6.4 Validação da técnica

Para a validação da PCR Multiplex para identificação e diferenciação entre as famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae, foram utilizadas 201 amostras sendo: 85 amostras de cercarias listadas na tabela 1, 108 de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados com trematódeos listadas na tabela 2, e oito de cercarias cedidas pelo Dr. Hudson Alves Pinto (Laboratório de Biologia de Trematódeos, Parasitologia/ICB/UFMG).

As amostras cedidas pelo Laboratório de Biologia dos Trematódeos foram utilizadas para a realização de um teste cego. Elas foram previamente identificadas por técnicas

morfológicas e estavam codificadas como A, B, C, D, E, F, G e H, de forma que sua identificação não foi revelada durante a realização do teste. Estavam fixadas em álcool 95% para extração de DNA e posterior identificação molecular. Todas as amostras tiveram seu DNA extraído seguindo o protocolo descrito no item 5.1 utilizando o kit DNeasy blood and tissue (Qiagen), dosadas no espectrofotômetro Nanodrop e 50ng de DNA de cada amostra foram utilizados como molde para a realização da PCR multiplex. O resultado obtido pela PCR multiplex foi conferido no Laboratório de Biologia dos Trematódeos.

7 Sequenciamento Nucleotídico e Análises Filogenéticas

A etapa de sequenciamento foi feita a partir do produto de PCR das amostras listadas na tabela 4 utilizando iniciadores universais obtidos da literatura direcionados para as regiões 18S, ITS e COI (Tabela 5). A purificação do produto de PCR foi realizada utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification da GE Healthcare, conforme o protocolo 5.4 do fabricante. Foi utilizado o sequenciador automático ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) usando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies), conforme recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram baseadas na técnica de sequenciamento por terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (ddNTPs) (SANGER et al., 1977). O sequenciamento foi realizado pela Macrogen.

Tabela 4- Amostras de cercarias sequenciadas.

Código da Amostra (Fiocruz-CMM)	Identificação da Amostra (Serviço Nacional de Referência em Esquistossomose)	Critério de Escolha da Amostra
8164	Ocelífera	Identificada por técnicas moleculares
14301	<i>Schistosoma mansoni</i>	Identificada por ambas as técnicas
14303	<i>Schistosoma mansoni</i>	Identificada por ambas as técnicas
14532	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	Identificada por ambas as técnicas
15169	Ocelífera	Identificada por ambas as técnicas
15277	Cercaria	Identificada por ambas as técnicas

16442	Com cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
16443	Com cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
16494	Com cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
16737	Sem cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
16738	Sem cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
16949	<i>Schistosoma mansoni</i>	Identificada por ambas as técnicas
16950	<i>Schistosoma mansoni</i>	Identificada por ambas as técnicas
17058	Sem cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
17070	Com cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
17071	Com cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
17229	<i>Schistosoma mansoni</i>	Identificada por ambas as técnicas
17231	<i>Schistosoma mansoni</i>	Identificada por ambas as técnicas
17278	Macrogranulosa	Identificada por ambas as técnicas
17595	Sem cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
17597	Sem cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
17599	Com cauda bifurcada	Identificada por técnicas morfológicas
17601	Sem cauda bifurcada	Identificada por ambas as técnicas
17650	<i>Schistosoma mansoni</i>	Identificada por técnicas moleculares
18040	Sem cauda bifurcada	Amostra sem identificação prévia
18042	Sem cauda bifurcada	Amostra sem identificação prévia
18044	Sem cauda bifurcada	Amostra sem identificação prévia
Clinostomum	N/A	Amostra controle
Echinostomatidae	N/A	Amostra controle
Riberoia	N/A	Amostra controle
Schistosomatidae	N/A	Amostra controle
Spirorchiidae	N/A	Amostra controle
Strigeidae	N/A	Amostra controle

N/A: não se aplica

Tabela 5- Iniciadores universais para trematódeos utilizados para o sequenciamento nucleotídico.

Nome do Iniciador	Sequencia 5'-3'	Tamanho do fragmento	Região	Referência
18S9F	TGATCCTGCCAGTAGCATATGCTTG	~600pb	18S rDNA	Moszczyńska et al. 2009
18S637R	TACGCTATTGGAGCTGGAGTTACCG		18S rDNA	Moszczyńska et al. 2009
Dice 1F	ATTAACCCTCACTAAATTWCNTTRGATCATAA G	~800pb	COI	Moszczyńska et al. 2009
Dice 14R	TAATACGACTCACTATACCHACMRATAACATA TGATG		COI	Steenkiste et al., 2015
ETTS1 F	TGCTTAAGTTCAGCGGGT	~1300pb	ITS1- 5.8S- ITS2	Kane & Rollison 1994
ETTS2 R	TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA		ITS1- 5.8S- ITS2	Kane & Rollison 1994

As sequências de DNA obtidas foram analisadas pelo programa PHRED (EWING et al., 1998) considerando um valor de qualidade de 20 e montadas através do programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) para a obtenção dos contigs. Para a confirmação das sequências com a região alvo e o organismo esperado, os contigs foram comparados com as sequências disponíveis depositadas no banco de dados do NCBI e a busca por similaridades, feita usando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Em seguida, as sequências foram alinhadas utilizando o programa MAFFT v7.0 (KATO e STANDLEY, 2013; KATO et al., 2002) e as regiões mal alinhadas ou ausentes foram removidas utilizando o programa Gblocks (CASTRESANA, 2000; TALAVERA, 2007). O melhor modelo de substituição nucleotídica para as análises filogenéticas foi determinado através do programa Jmodeltest (POSADA, 2008). Para as análises filogenéticas, foram utilizados os contigs obtidos na etapa anterior e sequências obtidas no NCBI para as famílias Clinostomidae (MF398350.1), Diplostomidae (MF398358.1) e Notocotyliidae (JQ766940.1). As árvores foram reconstruídas utilizando estimativas de máxima verossimilhança (ML) utilizando o programa PhyML (GUINDON et al., 2009 e 2010), com os modelos de distribuição nucleotídica: Kimura 80 (K80) com distribuição gama de 0.76; Generalized Time Reversible (GTR) com distribuição gama de 0.29; e Kimura 80 (K80) com distribuição gama de 0.23, respectivamente para os marcadores

S18, COI e ITS, com 1000 replicadas de *bootstrap*. As imagens das árvores filogenéticas finais foram geradas utilizando o programa FigTree v.1.4.2 (RAMBAUT, 2009).

,

1 Análise morfológicas e morfométricas

Das 85 amostras de cercarias utilizadas nesse estudo, 78 estavam armazenadas em duplicata sendo um tubo contendo fixador AFA e outro, criopreservado. As cercarias fixadas em AFA foram utilizadas para as análises morfológicas e morfométricas. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Biologia de Trematódeos da UFMG com a colaboração do Dr. Hudson Alves Pinto.

Todas as 78 amostras foram avaliadas em microscópio óptico em lâminas a fresco. Cinquenta e duas amostras estavam degradadas impossibilitando a sua identificação morfológica. Quinze amostras foram identificadas pela primeira vez. Dez amostras tiveram sua identificação confirmada e uma amostra teve sua identificação corrigida em relação à identificação prévia realizada pelo Moluscário Lobato Paraense no momento do exame de infectividade do molusco (Figura 9).

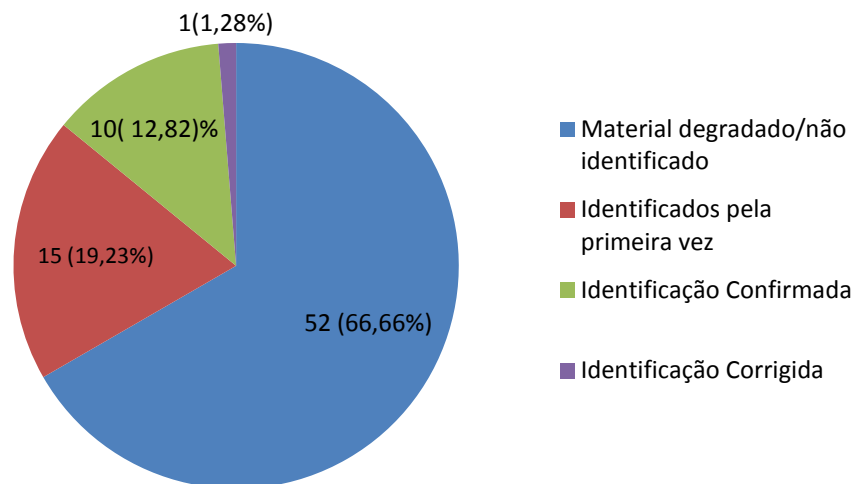


Figura 9: Representação gráfica do resultado das análises morfológicas das cercarias depositadas na Fiocruz-CMM.

As 26 amostras identificadas foram mensuradas, porém, devido a problemas relacionados ao processo de fixação das amostras adotado pelo SNRE, essas medidas não podem ser consideradas como confiáveis e esses dados não serão demonstrados aqui. Assim, para a identificação, levou-se em consideração apenas a presença e/ou ausência de caracteres taxonômicos como demonstrado na tabela 6. Entre o material identificado, tem-se: 11 amostras pertencentes à família Schistosomatidae, nove amostras de Echinostomatidae, cinco amostras de Strigeidae e uma amostra de Diplostomidae (Figura 10).

Tabela 6- Resultado das análises morfológicas das amostras de cercarias depositadas na Fiocruz-CMM feitas neste estudo.

Código da Amostra	Identificação Prévia Moluscário Lobato Paranesse	Resultado das Análises Morfológicas	Caracteres Morfológicos Observados
14289	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
14290	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
14301	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
14532	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	Strigeidae	Cercaria com cauda bifurcada, corpo em formato de gota.
15067	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
15091	Cercaria	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
15169	Ocelífera	Schistosomatidae	Cercaria com cauda bifurcada, com ocelos, sem crista.
16494	Cercaria com cauda bifurcada	Strigeidae	Cercaria com cauda bifurcada, corpo em formato de gota.
16737	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Tamanho e disposição dos grânulos. Cauda simples.
16738	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Tamanho e disposição dos grânulos. Cauda simples.
16759	Cercaria com cauda bifurcada	Strigeidae	Tronco curto e presença de células caudais. Cauda bifurcada.
16760	Cercaria com cauda bifurcada	Echinostomatidae	Tamanho e disposição dos grânulos. Cauda simples.
16761	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
16949	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
16950	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
17056	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Tamanho e disposição dos grânulos. Cauda simples.
17058	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Tamanho e disposição dos grânulos. Cauda simples.
17070	Cercaria com cauda bifurcada	Strigeidae	Tronco curto e presença de células caudais. Cauda bifurcada.
17071	Cercaria com cauda bifurcada	Strigeidae	Tronco curto e presença de células caudais. Cauda bifurcada.

17229	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
17231	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Cercaria brevifurcada e sem presença de ocelos.
17278	Macrogranulosa	Echinostomatidae	Presença de colar de espinhos na ventosa oral. Cauda simples
17595	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Presença de colar de espinhos na ventosa oral. Cauda simples
17597	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Presença de colar de espinhos na ventosa oral. Cauda simples
17599	Cercaria com cauda bifurcada	Diplostomidae	Cercaria longifurcada com presença de corpusculus caudais.
17601	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Presença de colar de espinhos na ventosa oral. Cauda simples

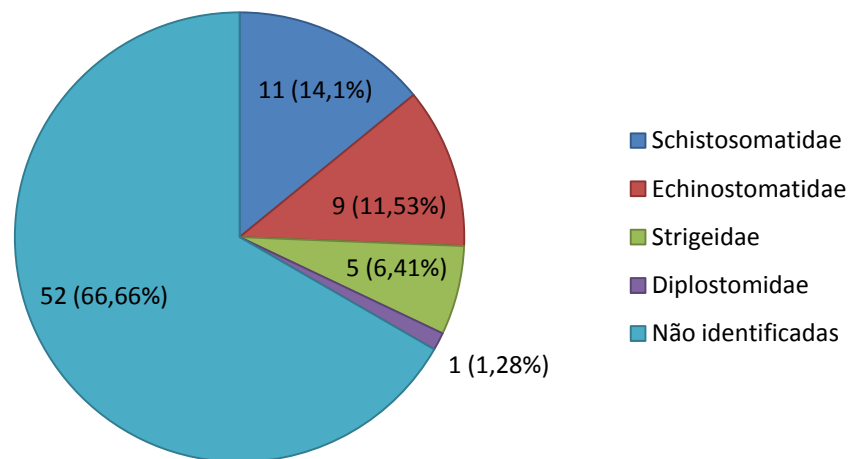


Figura 10: Representação gráfica do resultado das análises morfológicas agrupado por famílias.

A partir dos resultados obtidos nas análises morfológicas, o procedimento de fixação das cercarias na Fiocruz-CMM foi revisto e adequado para evitar degradação do material depositado no futuro. A adequação dos procedimentos foi realizada com a colaboração do Dr. Hudson Alves Pinto. Foi elaborado e publicado um Procedimento Operacional Padrão (POP) intitulado “Fixação, registro e armazenamento de cercarias no LHMM” (Anexo 1) que padroniza as etapas de fixação e preservação das amostras de cercarias.

2 Desenho dos iniciadores

Utilizando a ferramenta online TipMT, obteve-se quatro pares de iniciadores específicos para a família Clinostomidae, quatro para Echinostomatidae, três para Schistosomatidae e seis para Strigeidae (Tabela 7).

Tabela 7- Iniciadores família específicos desenhados pela ferramenta online TipMT.

Nome do Iniciador	Tamanho do amplicom	Região Alvo	Família Alvo
Clino 1F-1R	115 pb		Clinostomidae
Clino 2F-2R	105 pb		
Clino 3F-3R	115 pb		
Clino 4F-4R	115 pb		
Echino 1F-1R	172 pb		Echinostomatidae
Echino 2F-2R	171 pb		
Echino 3F-3R	172 pb		
Echino 4F-4R	171 pb		
Schis 1F-1R	140 pb	ITS (rDNA)	Schistosomatidae
Schis 2F-2R	140 pb		
Schis 3F-3R	140 pb		
Strig 1F-1R	183 pb		Strigeidae
Strig 2F-2R	184 pb		
Strig 3F-3R	183 pb		
Strig 4F-4R	184 pb		
Strig 5F-5R	183 pb		
Strig 6F-6R	184 pb		

Todos os iniciadores foram testados para verificação da especificidade e sensibilidade utilizando as amostras controles para as quatro famílias, outras famílias de trematódeos e moluscos do gênero *Biomphalaria*. Os iniciadores que tiveram o melhor desempenho com a mesma temperatura de anelamento de 62,5°C foram selecionados para a próxima etapa deste estudo, a saber: Clin 4F-R, Echi 1F-R, Schis 2F-R e Strig 5F-R (Tabela 8).

Tabela 8- Iniciadores família-específicos direcionados para a região ITS do rDNA selecionados para o estudo.

Nome do Iniciador	Sequencia 5'-3'	Tamanho do amplicon	Região Alvo	Organismo
Clin 4F	GGACTTGGGTGTAGCTGGAC	115 pb	ITS (rDNA)	Clinostomidae
Clin 4R	GACGCACAATAAGTCGTGGC			
Echi 1F	GTGCATGTGAGGTCAATGGC	172 pb		Echinostomatidae
Echin 1R	ATGTCCAAGCCAGGAGAACG			
Schis 2F	GCCACAGGATATCCCGTAGC	140 pb		Schistosomatidae
Schis 2R	GCGTACAACCTTTGAGCGGTG			
Strig 5F	CCGCTCAGAGTTGTACGACA	183 pb		Strigeidae
Strig 5R	TTGGTTAGGTCGGCTTGTCC			

3 Padronização dos iniciadores

A especificidade da reação de PCR utilizando cada par de iniciadores listado na tabela 9 foi testada à temperatura de anelamento (TM) de 62,5°C, utilizando como molde para a reação preparações de DNA genômico extraídas e diluídas para a concentração de 10ng/μl das seguintes amostras: Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae, Strigeidae, Diplostomidae, Spirorchiidae, *Cercaria lutzi*, cercaria do tipo monostoma, *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835), *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981, *B. straminea*, *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864). Todas as amostras utilizadas na padronização foram cedidas pela Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM) e pelo Laboratório de Biologia de Trematódeos (UFMG).

Todos os iniciadores se mostraram específicos havendo amplificação do DNA apenas das amostras da família-alvo sob a mesma temperatura de anelamento (Figuras 11 a 14).

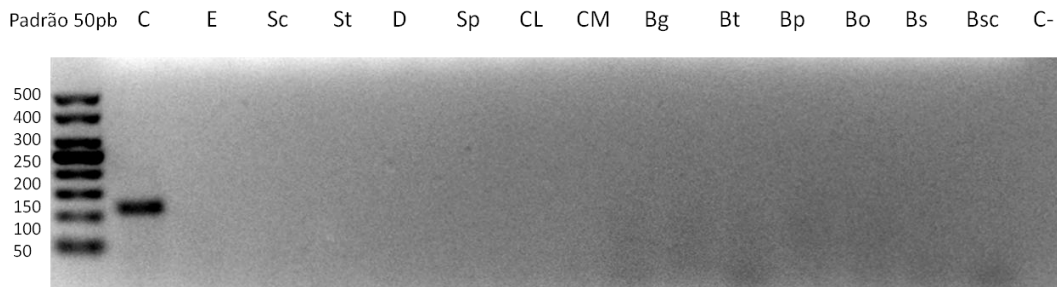


Figura 11: Teste de especificidade da reação utilizando o par de iniciadores Clin 4F-4R, selecionado pela ferramenta TipMT como específico para a família Clinostomidae, utilizando como molde para a reação 10ng de DNA das seguintes amostras: C= *Clinostomum complanatum* (Clinostomidae), E= *Drepanocephalus auritus* (Echinostomatidae), Sc= *Schistosoma mansoni* (Schistosomatidae), St= Strigeidae, D= *Austrodiplostomum* sp (Diplostomidae), Sp= Spirorchiidae, CL= Cercaria lutzi, CM= cercaria monostoma, Bg= *Biomphalaria glabrata*, Bt= *B. tenagophila*, Bp= *B. penegrina*, Bo= *B. occidentalis*, Bs= *B. straminea*, Bsc= *B. schrammi*, C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

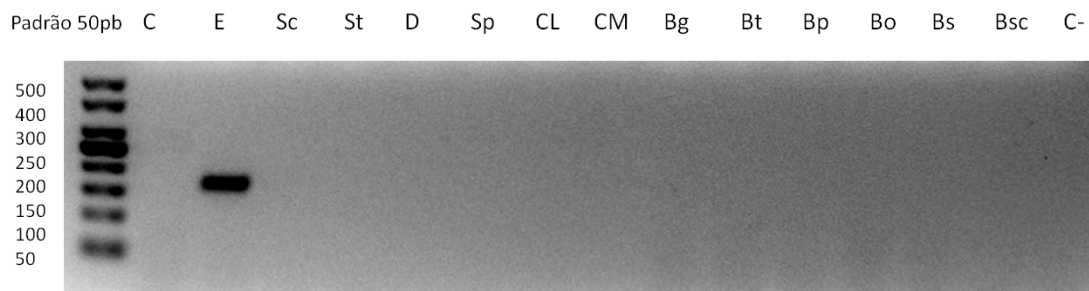


Figura 12: Teste de especificidade da reação utilizando o par de iniciadores Echi 1F-1R, selecionado pela ferramenta TipMT como sendo específico para a família Echinostomatidae, utilizando como molde para a reação 10ng de DNA das seguintes amostras: C= *Clinostomum complanatum* (Clinostomidae), E= *Drepanocephalus auritus* (Echinostomatidae), Sc= *Schistosoma mansoni* (Schistosomatidae), St= Strigeidae, D= *Austrodiplostomum* sp (Diplostomidae), Sp= Spirorchiidae, CL= Cercaria lutzi, CM= cercaria monostoma, Bg= *Biomphalaria glabrata*, Bt= *B. tenagophila*, Bp= *B. penegrina*, Bo= *B. occidentalis*, Bs= *B. straminea*, Bsc= *B. schrammi*, C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

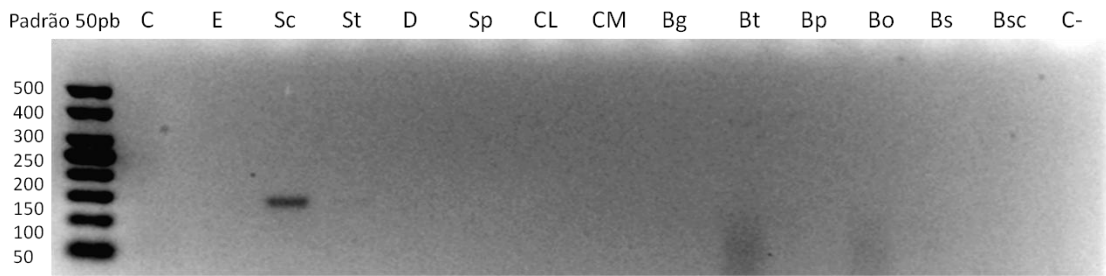


Figura 13: Teste de especificidade da reação utilizando o par de iniciadores Schis 2F-2R, selecionado pela ferramenta TipMT como sendo específico para a família Schistosomatidae, utilizando como molde para a reação 10ng de DNA das seguintes amostras: C= *Clinostomum complanatum* (Clinostomidae), E= *Drepanocephalus auritus* (Echinostomatidae), Sc= *Schistosoma mansoni* (Schistosomatidae), St= Strigeidae, D= *Austrodiplostomum* sp (Diplostomidae), Sp= Spirorchiidae, CL= *Cercaria lutzi*, CM= *cercaria monostoma*, Bg= *Biomphalaria glabrata*, Bt= *B. tenagophila*, Bp= *B. penegrina*, Bo= *B. occidentalis*, Bs= *B. straminea*, Bsc= *B. schrammi*, C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

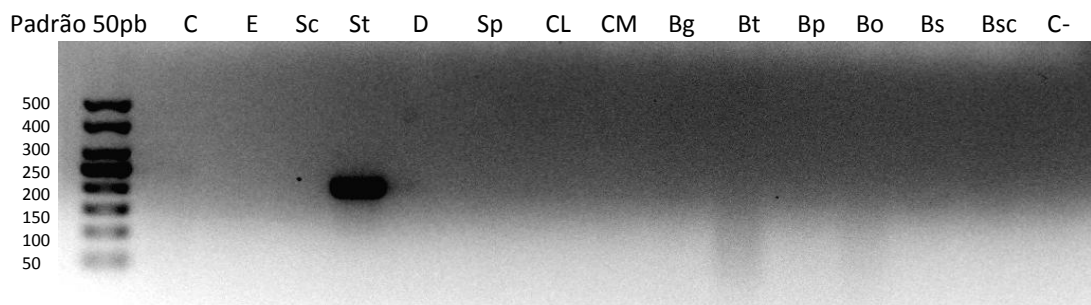


Figura 14: Teste de especificidade da reação utilizando o par de iniciadores Strig 5F-5R, selecionado pela ferramenta TipMT como sendo específico para a família Strigeidae, utilizando como molde para a reação 10ng de DNA das seguintes amostras: C= *Clinostomum complanatum* (Clinostomidae), E= *Drepanocephalus auritus* (Echinostomatidae), Sc= *Schistosoma mansoni* (Schistosomatidae), St= Strigeidae, D= *Austrodiplostomum* sp (Diplostomidae), Sp= Spirorchiidae, CL= *Cercaria lutzi*, CM= *cercaria monostoma*, Bg= *Biomphalaria glabrata*, Bt= *B. tenagophila*, Bp= *B. penegrina*, Bo= *B. occidentalis*, Bs= *B. straminea*, Bsc= *B. schrammi*, C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

A sensibilidade da reação de PCR utilizando os quatro pares de iniciadores foi testada utilizando diluições seriadas do DNA genômico de 10ng a 1fg para os pares de iniciadores Clin4F-4R, Echi 1F-1R e Schis 2F-2R; e de 10ng a 1da para o par de iniciadores Strig 5F-5R. Os iniciadores Clin4F-4R possuem uma sensibilidade de 0,1ng (Figura 15). Os iniciadores

Echi1F-1R e Schis 2F-2R possuem uma sensibilidade de 1fg (Figuras 16 e 17). Os iniciadores Strig5F-5R possuem uma sensibilidade de 1ag (Figura 18).

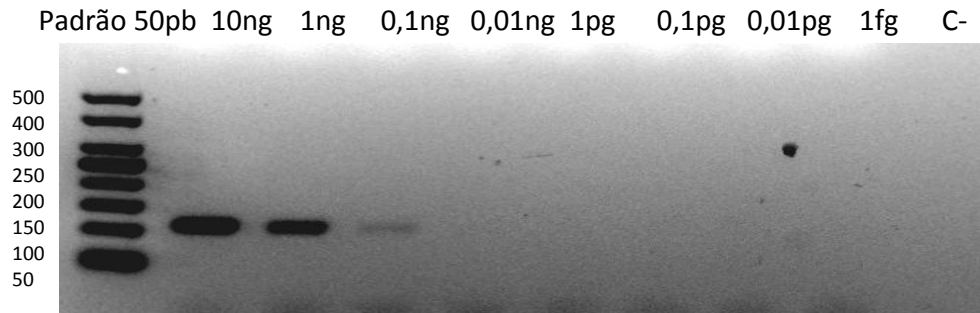


Figura 15: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Clin 4F-4R utilizando como molde amostra de DNA de *Clinostomum complanatum* em diluições seriadas de 10ng a 1fg. C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

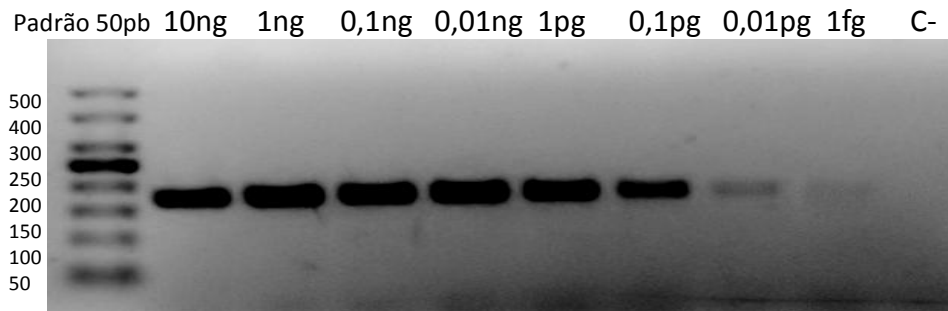


Figura 16: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Echi 1F-1R utilizando como molde amostra de DNA de *Drepanocephalus auritus* em diluições seriadas de 10ng a 1fg. C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

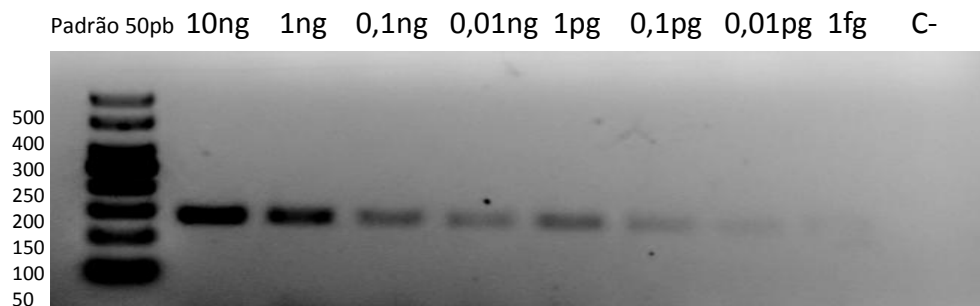


Figura 17: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Schis 2F-2R utilizando como molde amostra de DNA de *Schistosoma mansoni* em diluições seriadas de 10ng a 1fg. C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

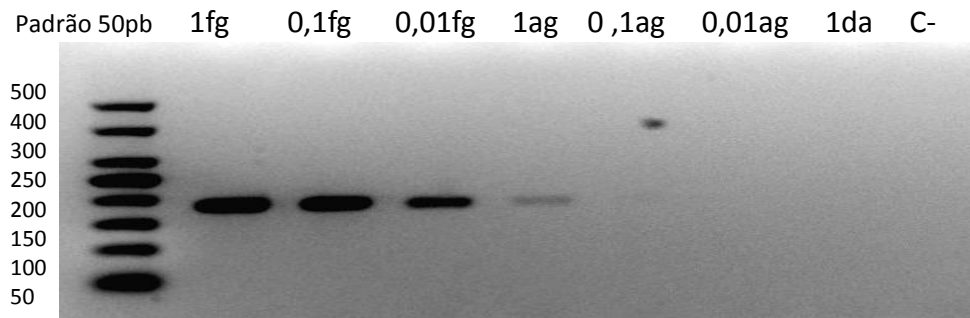


Figura 18: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Strig 5F-5R utilizando como molde amostra de DNA de Strigeidae em diluições seriadas de 10ng a 1da. C-= controle negativo. Resultado da sensibilidade da reação utilizando 10ng-0,01pg não mostrado. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

Para a simulação de coinfeccção foi preparado um *pool* contendo 10ng de DNA de cada representante das quatro famílias (*C. complanatum*, *D. auritus*, *S. manoni* e Strigeidae). Utilizando 10ng do *pool* preparado e 10ng de DNA das amostras de cada família como molde, foi feita a PCR convencional com cada um dos pares de iniciadores. Todos se mostraram capazes de detectar coinfeccções (Figura 19).

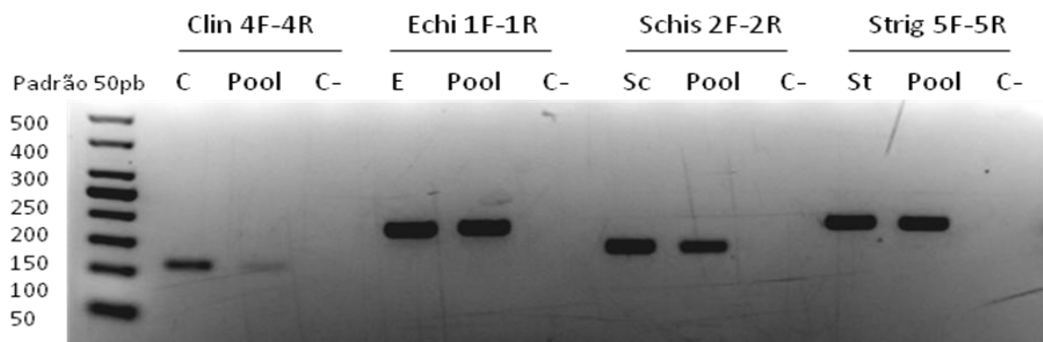


Figura 19: Simulação de coinfeccções utilizando 10ng de DNA de: C= *Clinostomum complanatum* (Clinostomidae), E= *Drepanocephalus auritus* (Echinostomaitidae), Sc= *Schistosoma mansoni* (Schistosomatidae), St= Strigeidae, *Pool*= *Pool* de DNA das quatro famílias, C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

A sensibilidade da reação de PCR utilizando cada par de iniciadores na detecção de coinfeccção foi testada utilizando diluições seriadas do *pool* de DNA das quatro famílias de 10ng a 1fg. Nas simulações de coinfeccção, os iniciadores Clin4F-4R possuem uma sensibilidade de 1ng (Figura 20), os iniciadores Echi1F-1R possuem uma sensibilidade de

0,01ng (Figura 21), os iniciadores Schis 2F-2R possuem uma sensibilidade de 1ng (Figura 22), e os iniciadores Strig5F-5R possuem uma sensibilidade de 1pg (Figura 23).



Figura 20: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Clin 4F-4R na detecção de coinfeção utilizando como molde diluições seriadas de 10ng a 1fg do pool de DNA de das quatro famílias. C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

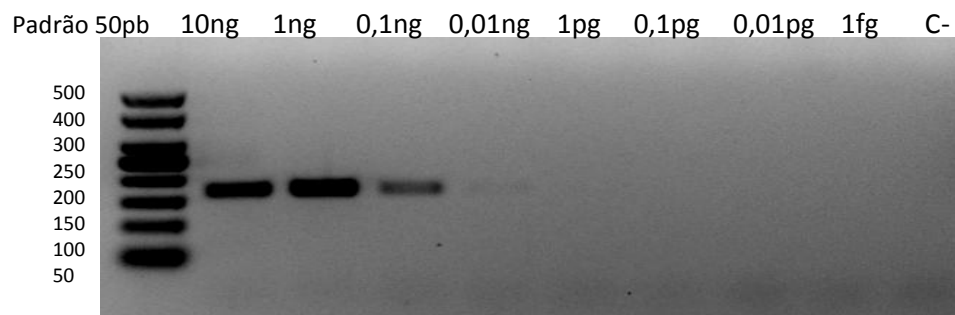


Figura 21: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Echi 1F-1R na detecção de coinfeção utilizando como molde diluições seriadas de 10ng a 1fg do pool de DNA de das quatro famílias. C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

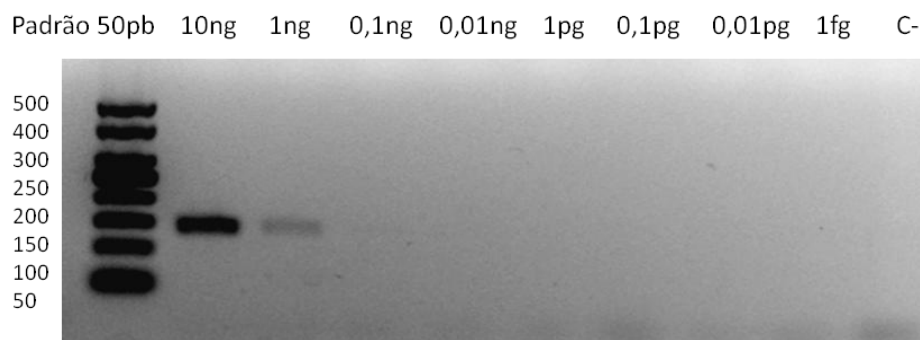


Figura 22: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Schis 2F-2R na detecção de coinfeção utilizando como molde diluições seriadas de 10ng a 1fg do pool de DNA de das quatro famílias. C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

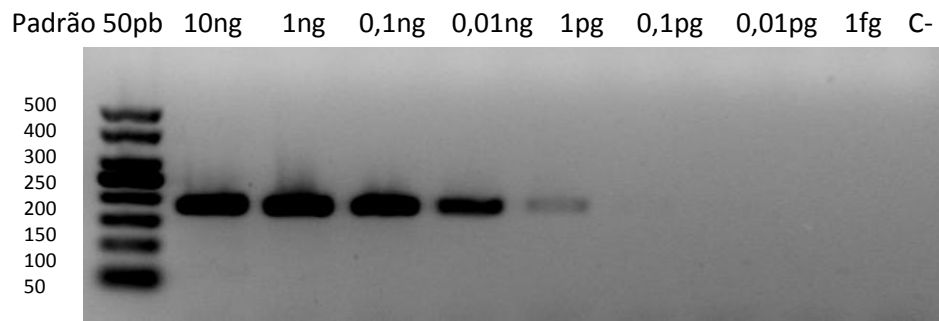


Figura 23: Teste de sensibilidade da reação utilizando o par de iniciadores Strig 5F-5R na detecção de coinfeção utilizando como molde diluições seriadas de 10ng a 1fg do pool de DNA de das quatro famílias. C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

Os iniciadores Schis 2F-2R foram testados para detecção de infecção por *S. mansoni* em amostras de *Biomphalaria* positivas e demonstraram-se capazes de serem utilizados para diagnóstico da infecção em moluscos (Figura 24).

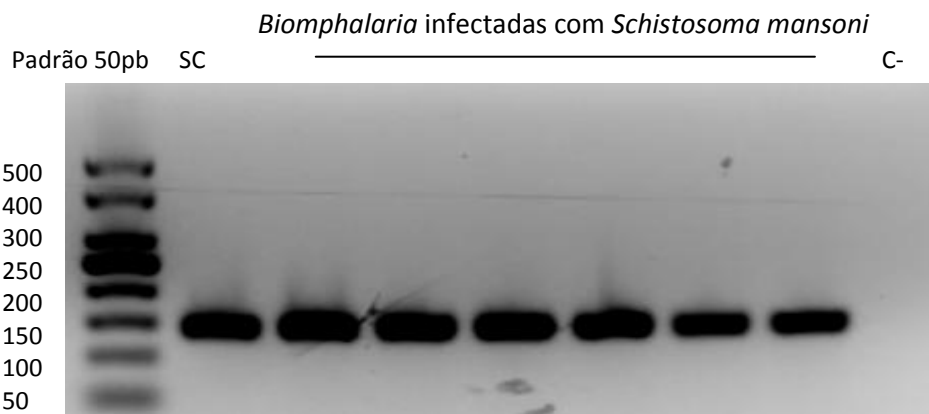


Figura 24: Teste de detecção de infecção por *Schistosoma mansoni* pelo par de iniciadores Schis 2F-2R utilizando 50ng de DNA de amostras de *Biomphalaria* contaminadas. SC= amostra controle de *Schistosoma mansoni*, C-= controle negativo. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

4 PCR Multiplex

Após a padronização da PCR convencional utilizando os quatro pares de primers desenhados e selecionados para este estudo, a técnica de PCR multiplex foi também padronizada à TM de 62,5 °C. A técnica se mostrou eficaz na identificação do trematódeo e na diferenciação entre as famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e

Strigeidae (Figura 25). Uma vez que os fragmentos gerados para as famílias Echinostomatidae e Strigeidae são próximos (172pb e 183pb, respectivamente), optou-se por aumentar a concentração do gel de agarose para 3% para possibilitar a melhor visualização do resultado.

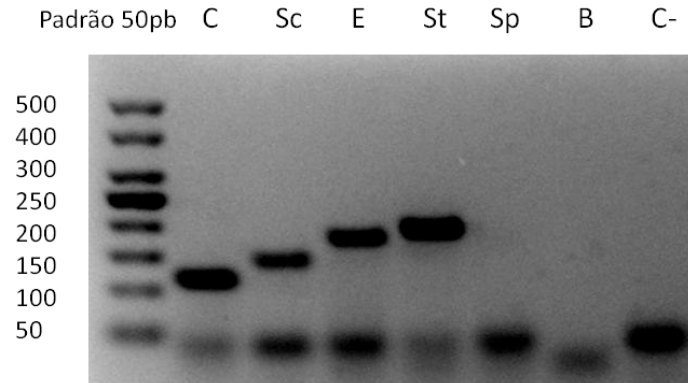


Figura 25: PCR multiplex utilizando os iniciadores Clin 4F-4R, Echi 1F-1R, Schis 2F-2R e Strig 5F-5R para identificação e diferenciação das famílias. Foram utilizados como molde para a reação 50ng de DNA das amostras: C= *Clinostomum complanatum* (Clinostomidae), E= *Drepanocephalus auritus* (Echinostomatidae), Sc= *Schistosoma mansoni* (Schistosomatidae), St= Strigeidae, Sp= Spirorchiidae, B= *Biomphalaria glabrata*, C-= controle negativo. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizado: 50pb.

Para avaliar a especificidade da reação de PCR multiplex, utilizou-se como molde para a reação amostras das quatro famílias-alvo (Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae, e Strigeidae), de trematódeos de outras famílias (Diplostomidae, Spirorchiidae, Fasciolidae, *Cercaria lutzi* e cercaria do tipo monostoma), de um nematódeo (*Angiostrongylus cantonensis*), de espécies de *Biomphalaria* encontradas no Brasil (*Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. penegrina*, *B. oligoza*, *B. occidentalis*, *B. schrammi*, *B. cousini*, *B. amazonica*, *B. kuhniiana*) e de espécimes de *Biomphalaria* coletadas em campo e parasitadas com trematódeos. Não foi observada nenhuma amplificações inespecíficas (Figura 26).

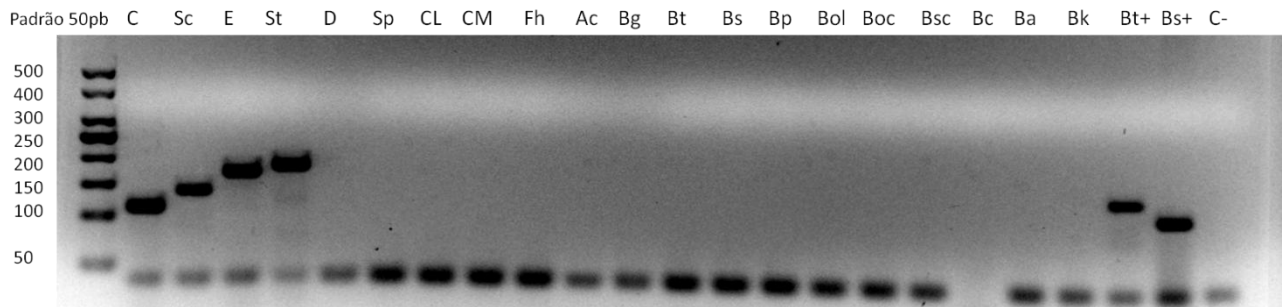


Figura 26: Teste de especificidade da PCR multiplex utilizando como molde 50ng de DNA das amostras: C= *Clinostomum complanatum* (Clinostomidae), E= *Drepanocephalus auritus* (Echinostomatidae), Sc= *Schistosoma mansoni* (Schistosomatidae), St= Strigeidae, D= *Austrodiplostomum* sp (Diplostomidae), Sp= Spirorchiidae, CL= *Cercaria lutzi*, CM= cercaria monostoma, Fh= *Fasciola hepatica*, Ac= *Angiostrongylus cantonensis*, Bg= *Biomphalaria glabrata*, Bt= *B. tenagophila*, Bs= *B. straminea*, Bp= *B. penegrina*, Bol= *B. oligoza*, Boc= *B. occidentalis*, Bsc= *B. schrammi*, Bc= *B. cousini*, Ba= *B. amazonica*, Bk= *B. kuhniana*, Bt+= *B. tenagophila* parasitada com cercária da família Schistosomatidae*, Bs+= *B. straminea* parasitada com cercária da família Clinostomidae*, C-= controle negativo.

*Amostras do acervo da Fiocruz-CMM coletadas em campo. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizado: 50pb.

Para avaliar a capacidade da reação de PCR multiplex na detecção da coinfeção, foram feitos *pools* utilizando 50ng de DNA das famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae em preparação simulando todas as combinações possíveis de coinfeção entre elas, a saber: (1) Clinostomidae + Schistosomatidae; (2) Clinostomidae + Echinostomatidae; (3) Clinostomidae + Strigeidae; (4) Echinostomatidae + Schistosomatidae; (5) Echinostomatidae + Strigeidae; (6) Schistosomatidae + Strigeidae; (7) Clinostomidae + Echinostomatidae + Schistosomatidae; (8) Clinostomidae + Schistosomatidae + Strigeidae; (9) Clinostomidae + Echinostomatidae + Schistosomatidae + Strigeidae; (10) Clinostomidae + Schistosomatidae + Strigeidae; 11= Echinostomatidae + Schistosomatidae + Strigeidae. A PCR multiplex se mostrou eficaz para detectar coinfeção na maioria dos casos (Figura 27). A coinfeção entre Echinostomatidae e Strigeidae, devido à proximidade do tamanho do fragmento gerado, pode ser de difícil visualização como observado nas canaletas 5 e 9. Nas canaletas 9, 10 e 11 observa-se a diminuição da resolução da visualização da coinfeção, o que pode ter sido resultado do esgotamento dos reagentes durante a reação devido à maior quantidade de DNA utilizada como molde (50ng de cada família).

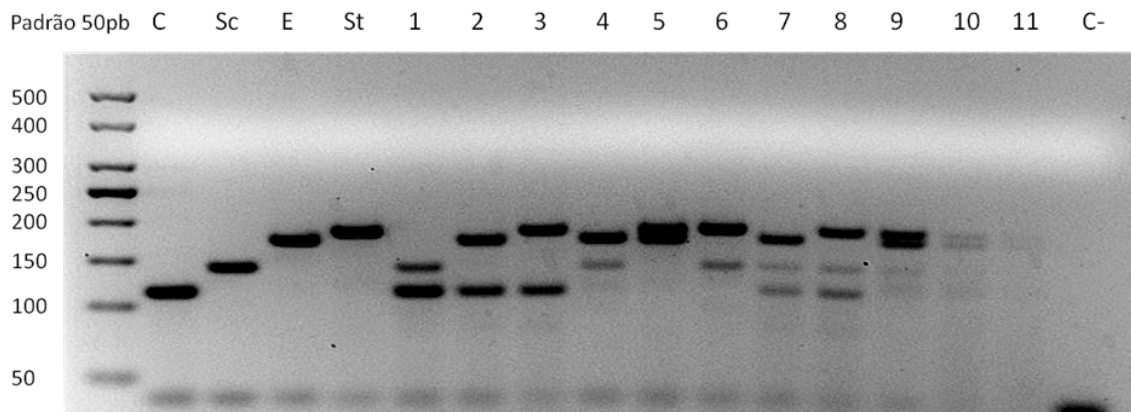


Figura 27: Detecção de coinfeção pela PCR multiplex utilizando como molde para a reação 50ng de DNA das amostras: C= *Clinostomum complanatum* (Clinostomidae), E= *Drepanocephalus auritus* (Echinostomatidae), Sc= *Schistosoma mansoni* (Schistosomatidae), St= Strigeidae. 1= C + Sc; 2= C+E; 3= C+ St; 4=E+Sc; 5= E+St; 6= Sc+ St; 7= C+E+Sc; 8= C+Sc+St; 9= C+E+Sc+St; 10= C+Sc+St; 11= E+Sc+St; C-= controle negativo. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizaod: 50pb.

5 Validação

5.1 Amostras de cercarias obtidas na Fiocruz-CMM

As 85 amostras de cercarias listada na tabela 1 foram utilizadas como molde para a as reações de PCR, usando os quatro pares de iniciadores desenhados pelo TipMT. Os resultados obtidos estão sintetizados na tabela 9. As 49 amostras identificadas foram separadas nas seguintes categorias: confirmada (quando a identificação prévia foi confirmada pela identificação molecular), identificada pela primeira vez e corrigida (quando a identificação prévia não corresponde à identificação molecular).

Tabela 9- Resultados da identificação por técnicas moleculares das amostras de cercarias.

Código da Amostra	Identificação Prévia Moluscário Lobato Paranesse	Resultado das Análises Morfológicas	Resultado da PCR Específica	Resultado da PCR Multiplex	Categoria
8164	Ocelifera	N/A	Clinostomidae	Clinostomidae	Confirmado
14289	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Confirmado
14290	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomaidae	Schistosomatidae	Confirmado
14301	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomaidae	Schistosomatidae	Confirmado

14303	<i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomidae	Schistosomatidae	Confirmado
14532	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	Strigeidae	Clinostomidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14577	Cercaria com cauda bifurcada	N/A	Strigeidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14700	Cercaria com cauda bifurcada	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14702	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14762	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15067	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	N/A	Confirmado
15069	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15071	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15087	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15089	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15091	Cercaria	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15160	Macrogranulosa	N/A	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Confirmado
15162	Caratinguensis	N/A	Clinostomidae	N/A	Corrigido
15169	Ocelífera	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Corrigido
15171	Macrogranulosa	N/A	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Confirmado
15244	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15246	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15277	Cercaria	N/A	Strigeidae	Strigeidae	Identificado pela primeira vez
15588	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
16442	Cercaria com cauda bifurcada	N/A	Strigeidae	Strigeidae	Identificado pela primeira vez

					vez
16443	Cercaria com cauda bifurcada	N/A	Strigeidae	Strigeidae	Identificado pela primeira vez
16494	Cercaria com cauda bifurcada	Strigeidae	Strigeidae	N/A	Identificado pela primeira vez
16600	Cercaria	N/A	Strigeidae	N/A	Identificado pela primeira vez
16737	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
16738	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
16759	Cercaria com cauda bifurcada	Strigeidae	Strigeidae	Strigeidae	Identificado pela primeira vez
16760	Cercaria com cauda bifurcada	Echinostomatidae	Strigeidae	N/A	Identificado pela primeira vez
16805	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Strigeidae	N/A	Identificado pela primeira vez
16949	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Confirmado
16950	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Confirmado
17056	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Identificado pela primeira vez
17058	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Identificado pela primeira vez
17070	Cercaria com cauda bifurcada	Strigeidae	Strigeidae	Strigeidae	Identificado pela primeira vez
17071	Cercaria com cauda bifurcada	Strigeidae	Strigeidae	Strigeidae	Identificado pela primeira vez
17102	Cercaria com cauda bifurcada	N/A	Strigeidae	Strigeidae	Identificado pela primeira vez
17229	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Confirmado
17231	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Confirmado
17276	Macrogranulosa	N/A	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Confirmado
17278	Macrogranulosa	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	Confirmado
17496	Cercaria	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez

17595	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae/ Schistosomatidae	Echinostomatidae/ Schistosomatidae	Identificado pela primeira vez
17597	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
17601	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Identificado pela primeira vez
17650	<i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Confirmado

N/A: não se aplica

Das 26 amostras identificadas através de técnicas morfológicas, 2 (7,69%) não foram identificadas por técnicas moleculares, 2 (7,69%) apresentaram identificação inconclusiva uma vez que os resultados foram diferentes em cada técnica e 22 (84,62%) apresentaram resultados concordantes em ambas as técnicas (Figura 28).

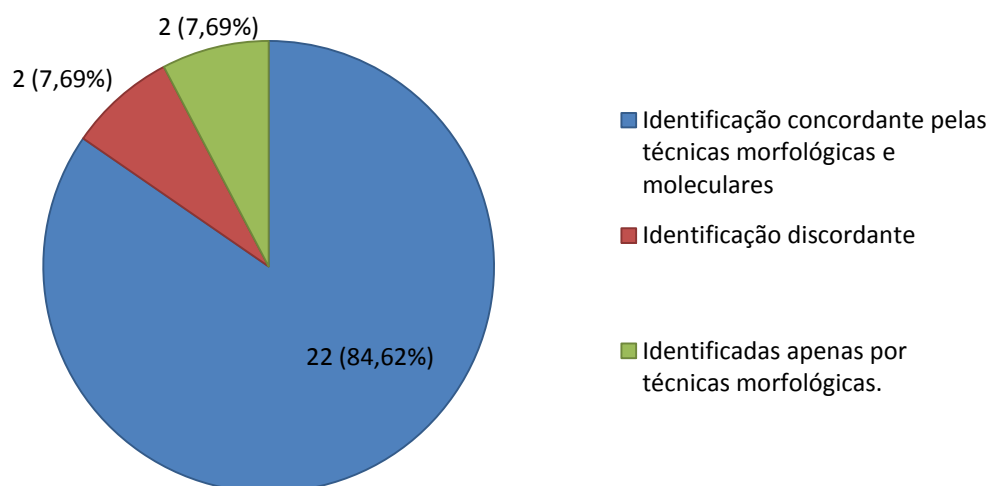


Figura 28: Representação gráfica dos resultados obtidos pela identificação por técnicas morfológicas e moleculares das cercarias.

Das 85 amostras testadas, 49 (57,64%) foram identificadas técnicas moleculares e apresentando os seguintes resultados: 32 amostras foram identificadas pela primeira vez (37,64%), 15 amostras tiveram sua identificação confirmada (17,64%) e 2 amostras tiveram sua identificação corrigida (2,35%), enquanto 36 amostras (42,35%) não foram identificadas (Figura 29).

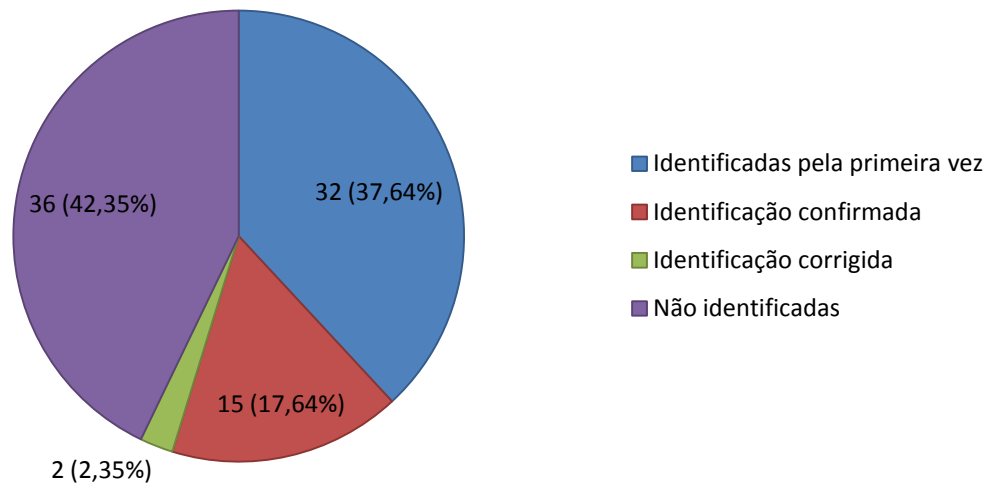


Figura 29: Representação gráfica dos resultados da identificação molecular das cercarias.

Entre as 49 amostras identificadas por técnicas moleculares, 25 (51%) amostras foram amplificadas por PCR multiplex e todas (100%) foram amplificadas pela PCR convencional. Na figura 30 é possível visualizar em gel de agarose 3% o resultado da PCR multiplex para algumas das 25 amostras de cercarias identificadas. Foi detectada uma coinfeção (2,04%) de Echinostomatidae e Schistosomatidae, 19 amostras (38,77%) foram identificadas como pertencentes à família Schistosomatidae, 14 amostras (28,57%) como Echinostomatidae, 12 amostras (24,48%) como Strigeidae e três amostras (6,12%) como Clinostomidae (Figura 31).

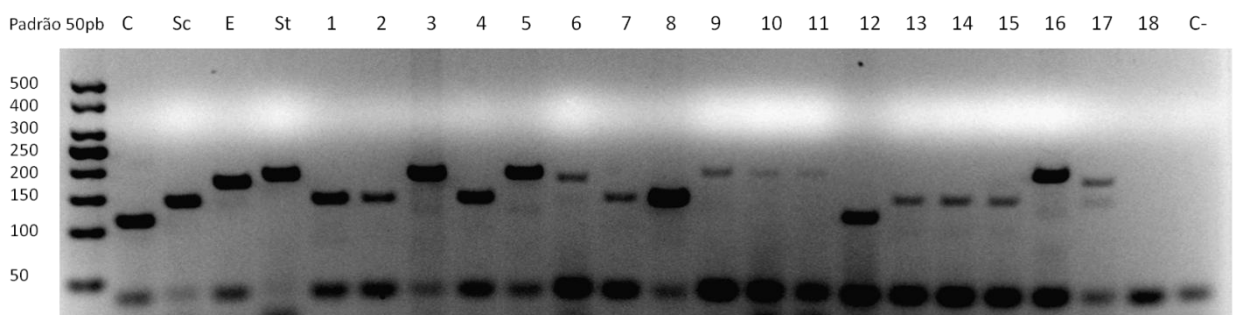


Figura 30: Validação da PCR multiplex utilizando como molde para a reação 50ng de DNA de amostras de cercarias obtidas na Fiocruz-CMM. C= *Clinostomum complanatum* (Clinostomidae), Sc= *Schistosoma mansoni* (Schistosomatidae), E= *Drepanocephalus auritus* (Echinostomatidae), St= Strigeidae. Amostras 1 (14289), 2 (14290), 4 (17229), 7 (14303), 8 (17650), 13 (15169), 14 (16949) e 15 (16950): família Schistosomatidae. Amostras 3 (16443), 5 (16442), 9 (17070), 10 (15277), 11 (17102) e 16 (17071): família Strigeidae. Amostra 6 (15171): família Echinostomatidae. Amostra 12 (8164): família Clinostomidae. Amostra 17 (17595): coinfeção com cercárias das famílias Echinostomatidae e Schistosomatidae. Amostra 18: família Spirorchiidae. C-= controle negativo. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizado: 50pb.

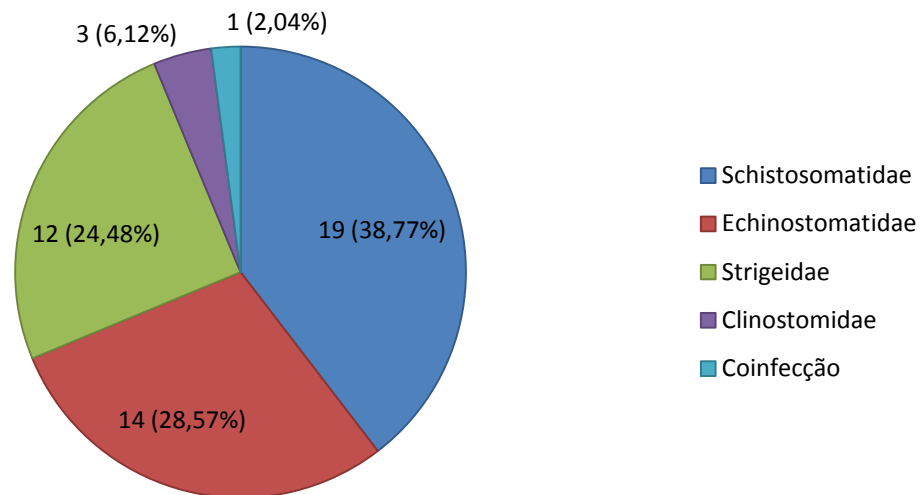


Figura 31: Representação gráfica do resultado da identificação por famílias das cercarias por técnicas moleculares.

5.2 Amostras de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados depositados na Fiocruz-CMM

As 108 amostras de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados listadas na tabela 2 foram utilizadas como molde para a realização da PCR multiplex e da PCR convencional usando cada um dos quatro pares de iniciadores desenhados pelo TipMT. Os resultados obtidos estão sintetizados na tabela 10.

Tabela 10- Resultados da identificação de trematódeos por técnicas moleculares a partir de amostras de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados.

Código da Amostra (Fiocruz-CMM)	Identificação do Trematódeo (Moluscário Lobato Paraense- Fiocruz)	Resultado da PCR Específica	Resultado da PCR Multiplex	Categoria
11987	N/A	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Identificado pela primeira vez
11988	N/A	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Identificado pela primeira vez
12277	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Confirmado
12278	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Confirmado
12348	Macrogranulosa	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Confirmado
12413	Caratinguensis	Echinostomatidae	N/A	Corrigido

12414	Caratinguensis	Echinostomatidae	N/A	Corrigido
12428	Macrogranulosa	Echinostomatidae	N/A	Confirmado
12430	Macrogranulosa	Strigeidae	N/A	Corrigido
12432	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	N/A	Confirmado
12464	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
12791	Macrogranulosa	Echinostomatidae	N/A	Confirmado
12797	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
12964	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
12965	N/A	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Identificado pela primeira vez
12978	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
13892	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
13894	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14379	N/A	Clinostomidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14533	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14557	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14559	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14576	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
14817	Cercaria com cauda não bifurcada	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15159	Macrogranulosa	Echinostomatidae	N/A	Confirmado
15170	Macrogranulosa	Echinostomatidae	N/A	Confirmado
15569	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15570	N/A	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
15903	Cercaria com cauda não bifurcada	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
17649	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
17665	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
17666	N/A	Schistosomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez

N/A: não se aplica

Das 108 amostras testadas, 32 (29,62%) foram amplificadas e identificadas por técnicas moleculares apresentando os seguintes resultados: 21 amostras foram identificadas pela primeira vez (19,44%), 8 amostras tiveram sua identificação confirmada (7,4%) e 3 amostras tiveram sua identificação corrigida (2,77%), enquanto 76 amostras (70,37%) não foram amplificadas por nenhuma das técnicas testadas (Figura 32).

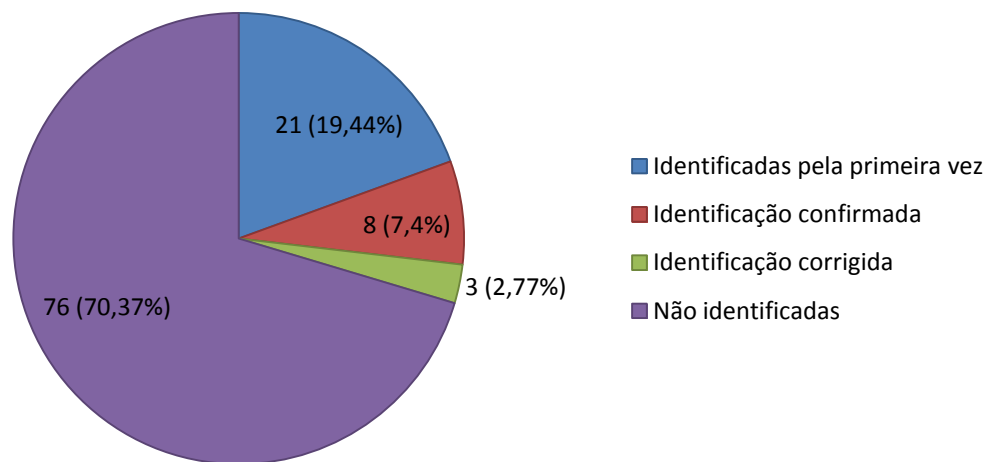


Figura 32: Representação gráfica do resultado da identificação por técnicas moleculares das amostras de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectadas.

Entre as 32 amostras identificadas por técnicas moleculares, seis (18,75%) amostras foram amplificadas por PCR multiplex e todas (100%) foram amplificadas pela PCR convencional. Dezesete amostras (53,12%) foram identificadas como pertencentes à família Echinostomatidae, 13 amostras (40,62%) como Schistosomatidae, uma amostra (3,12%) como Strigeidae e uma amostra (3,12%) como Clinostomidae (Figura 33).

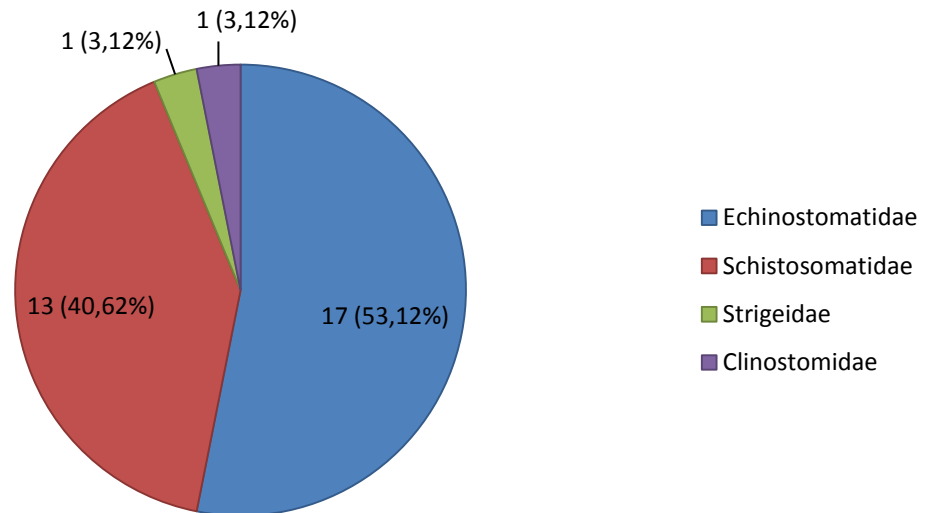


Figura 33: Representação gráfica do resultado da identificação por famílias por técnicas moleculares das amostras de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectadas.

O acervo de moluscos infectados passou a ser classificado então da seguinte forma: 15,74% da cercarias família Echinostomatidae, 12,03% da família Schistosomatidae, 0,92% da família Strigeidae, 0,92% da família Clinostomidae e 70,37% do acervo permaneceu sem identificação. Entre as amostras identificadas por técnicas moleculares, apenas 18,75% delas foram amplificadas pela PCR multiplex. Durante etapa de padronização dos iniciadores, foi observado que eles são eficazes para identificação da presença de infecção utilizando amostra de molusco infectado como molde para a PCR, entretanto, os resultados das análises moleculares dos moluscos criopreservados não foram muito satisfatórios. A baixa taxa de identificação pode ser explicada por: (1) as amostras estavam degradadas impossibilitando a identificação molecular; (2) a quantidade de DNA do parasito era muito menor em comparação à quantidade de DNA do molusco, e o excesso de DNA pode ter inibido a reação, (3) o fragmento de tecido do molusco utilizado para a extração de DNA possuía pouco ou nenhum material de trematódeo associado, (4) o material pode pertencer à outra família de trematódeo que o painel de iniciadores desenhados nesse estudo não abrange. Maiores estudos são necessários para a identificação do restante do material.

5.3 Amostras de cercarias cedidas pelo Laboratório de Biologia dos Trematódeos (Parasitologia/ICB/UFMG)

Foi realizada a PCR multiplex utilizando como molde as amostras cedidas para o teste cego. A amostra A foi identificada como pertencente à família Clinostomidae. As amostras B e D foram identificadas como pertencente à família Schistosomatidae. As amostras C e F foram identificadas como pertencentes à família Echinostomatidae. As amostras E, G e H não foram identificadas. (Figura 34).

Após a realização da PCR multiplex, o resultado foi conferido no Laboratório de Biologia de Trematódeos. As amostras estavam identificadas como: (A) *Clinostomum* sp., (B) Schistosomatidae; (C) Echinostomatidae sp1, (D) *Schistosoma mansoni*, (E) Spirorchiidae, (F) Echinostomatidae sp2, (G) Diplostomidae, (H) Spirorchiidae. Esses dados comprovam a eficácia dos iniciadores na identificação e diferenciação das famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae.

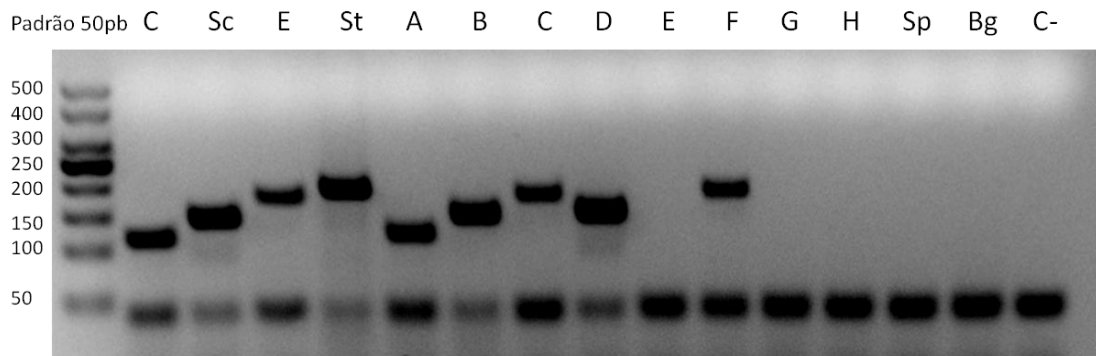


Figura 34: Teste cego da PCR multiplex utilizando como molde 50ng de DNA das amostras A-H cedidas pelo Laboratório de Biologia de Trematódeos. Cl = controle de Clinostomidae, Sc= controle de Schistosomatidae, E= controle de Echinostomatidae, St= controle de Strigeidae, A= *Clinostomum* sp., B= Schistosomatidae, C= Echinostomatidae sp1, D= *Schistosoma mansoni*, E= Spirorchiidae, F= Echinostomatidae sp2, G= Diplostomidae, H= Spirorchiidae, Sp= controle de Spirorchiidae, Bg= controle de *Biomphalaria glabrata*, C-= controle negativo. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo. Padrão de peso molecular utilizado: 50pb.

6 Sequenciamento Nucleotídico e Análises Filogenéticas

Todas as amostras de cercarias que foram identificadas em etapas anteriores deste estudo (análises morfológicas e/ou moleculares) e as amostras de cercarias utilizadas como

controles (cedidas pelo Laboratório de Biologia de Trematódeos) foram testadas utilizando os iniciadores listados na tabela 5. As amostras que foram amplificadas foram selecionadas para a realização do sequenciamento. Além delas, dentre as amostras sem identificação prévia, três foram selecionadas de forma aleatória, testadas quanto à amplificação das regiões alvo e sequenciadas totalizando 33 amostras. Destas, 18 amostras tiveram a região parcial do 18S do rDNA sequenciada; 25 as regiões ITS 1 e 2 do rDNA; e 12 parte do gene COI do mtDNA (Tabela 11).

Tabela 11- Regiões sequenciadas das amostras de cercarias

Código da Amostra (Fiocruz-CMM)	Identificação da Amostra (Serviço Nacional de Referência em Esquistossomose)	Região(ões) Sequenciada(s)
8164	Ocelífera	18S - ITS
14301	<i>Schistosoma mansoni</i>	18S - ITS
14303	<i>Schistosoma mansoni</i>	ITS - COI
14532	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	18S - ITS
15169	Ocelífera	ITS
15277	Cercaria	COI
16442	Com cauda bifurcada	ITS - COI
16443	Com cauda bifurcada	ITS - COI
16494	Com cauda bifurcada	ITS
16737	Sem cauda bifurcada	18S
16738	Sem cauda bifurcada	18S - ITS
16949	<i>Schistosoma mansoni</i>	ITS
16950	<i>Schistosoma mansoni</i>	18S - ITS - COI
17058	Sem cauda bifurcada	18S - ITS
17070	Com cauda bifurcada	18S - ITS
17071	Com cauda bifurcada	18S - ITS
17229	<i>Schistosoma mansoni</i>	18S - ITS
17231	<i>Schistosoma mansoni</i>	18S
17278	Macrogranulosa	18S
17595	Sem cauda bifurcada	COI
17597	Sem cauda bifurcada	COI
17599	Com cauda bifurcada	18S - ITS
17601	Sem cauda bifurcada	COI
17650	<i>Schistosoma mansoni</i>	ITS
18040	Sem cauda bifurcada	ITS
18042	Sem cauda bifurcada	ITS - COI
18044	Sem cauda bifurcada	ITS
Clinostomum	N/A	COI

Echinostomatidae	N/A	18S - ITS
Riberoia	N/A	18S - ITS - COI
Schistosomatidae	N/A	18S -ITS
Spirorchiidae	N/A	18S - ITS - COI
Strigeidae	N/A	18S -ITS

N/A: não se aplica

As sequencias obtidas foram alinhadas, o que permite visualizar mais facilmente as regiões conservadas ou polimórficas que poderão ser utilizadas para a expansão do painel de iniciadores obtido neste estudo. As sequencias de parte do gene COI não obtiveram um alinhamento confiável, dessa forma, foram retiradas das análises. Posteriormente serão feitos novos sequenciamentos a fim de complementar as análises obtidas neste estudo.

Foram geradas duas árvores filogenéticas com as sequencias parciais do gene 18S e da região ITS do rDNA (Figuras 35 e 36, respectivamente), mostrando na maioria dos casos, um agrupamento das amostras da mesma família, como esperado.

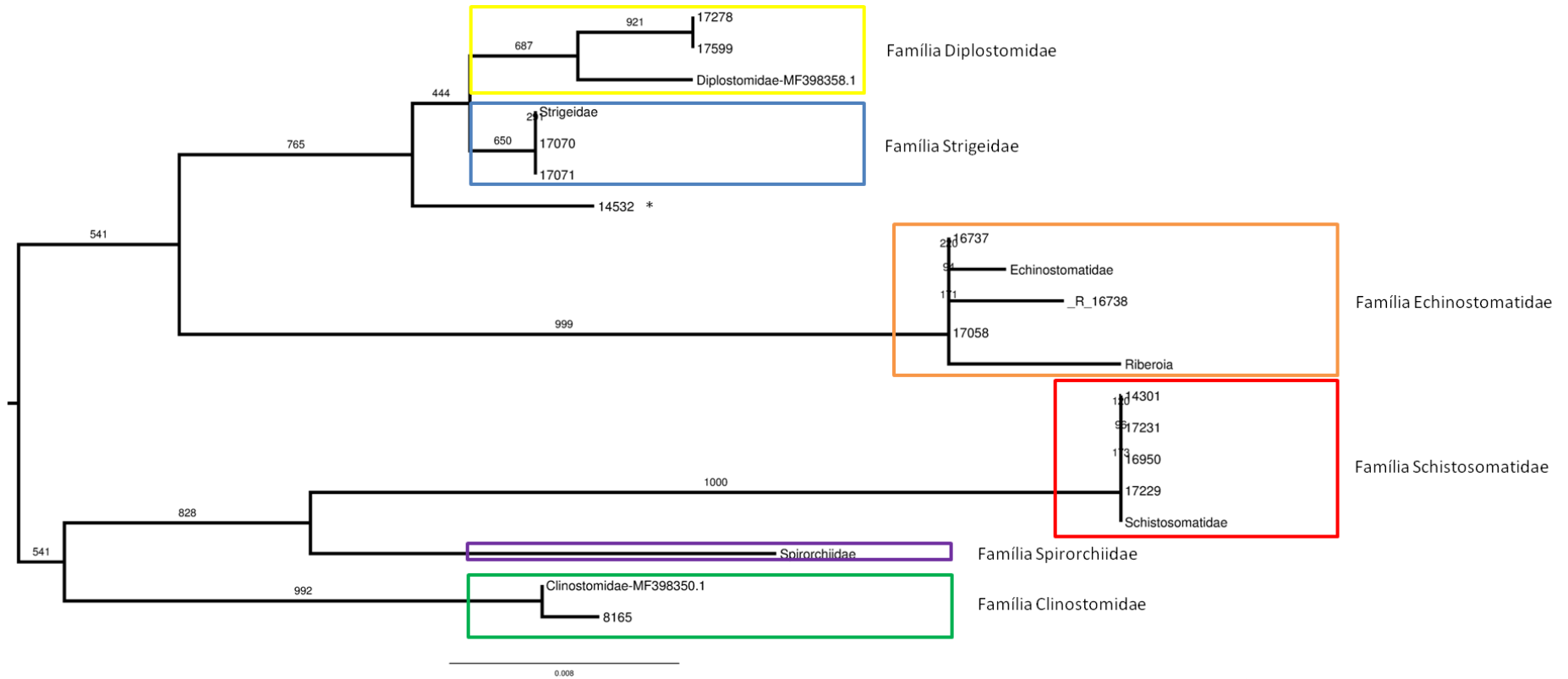


Figura 35: Árvore filogenética demonstrando a relação entre sequências parciais do gene 18S do rDNA das amostras listadas na tabela 4 e obtidas no NCBI (Diplostomidae-MF3986358.1/ Clinostomidae-MF398350.1). As relações filogenéticas foram inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança e o número demonstrando em cada ramo representa valores de *bootstrap* (1000 repetições).
 Legenda: *-amostra cuja identificação nesta etapa foi inconclusiva.

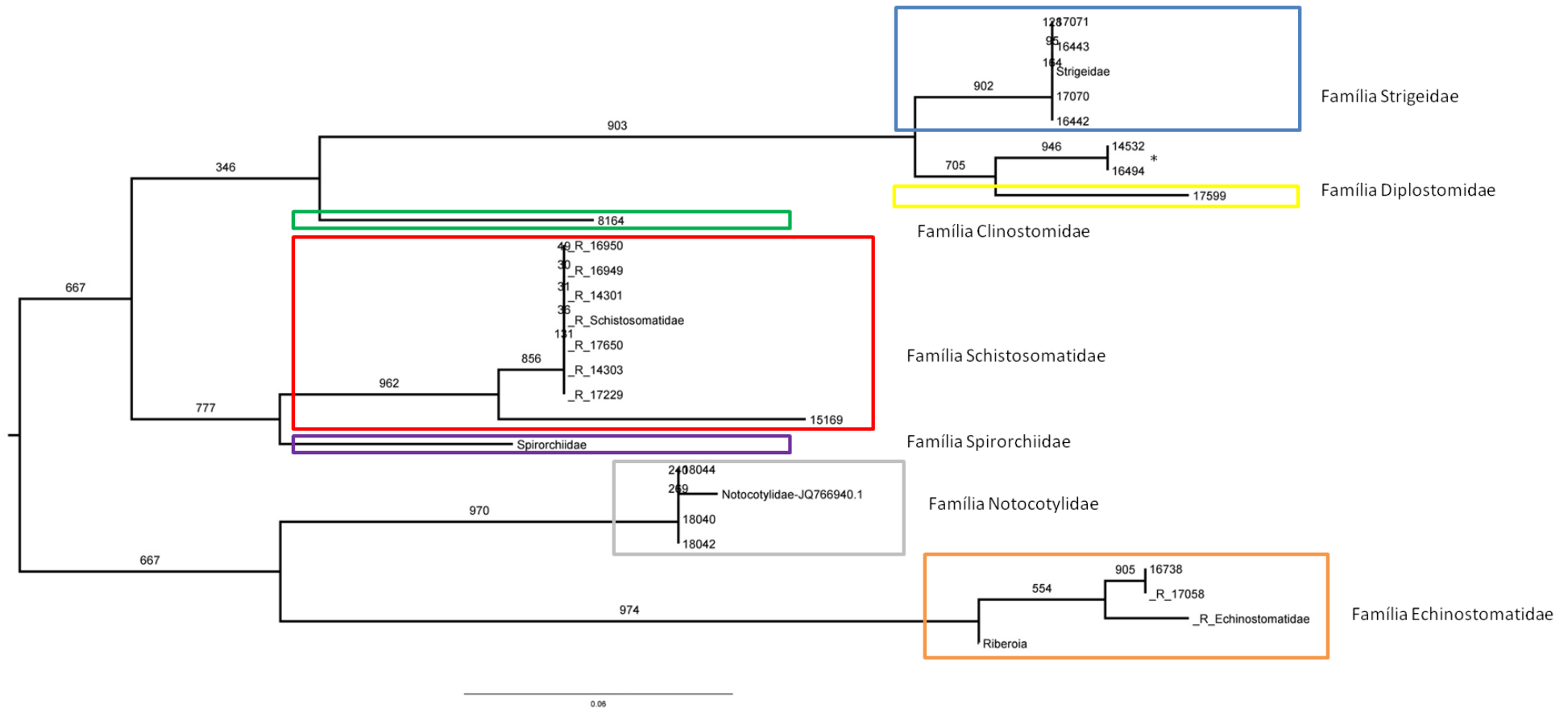


Figura 36: Árvore filogenética demonstrando a relação entre seqüências da região ITS do rDNA das amostras listadas na tabela 4 e obtidas no NCBI (Notocotylidae- JQ766940.1). As relações filogenéticas foram inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança e o número demonstrando em cada ramo representa valores de *bootstrap* (1000 repetições).

Legenda: *-amostras cuja identificação nesta etapa foi inconclusiva.

Em alguns casos, a filogenia não foi muito informativa. A amostra 14532 (que teve sua identificação inconclusiva neste trabalho) e a amostra 16494 (identificada neste estudo como pertencente à família Strigeidae) agruparam-se a uma amostra da família Diplostomidae na árvore filogenética gerada pelas sequências de ITS. Na filogenia por sequências de parte do gene 18S, a amostra 14532 compôs um ramo isolado, próximo ao agrupamento da família Strigeidae. Em todos estes casos, o valor de *bootstrap* foi baixo indicando a necessidade de novos sequenciamentos para uma análise mais robusta.

Já no caso das amostras 18040, 18042 e 18044, o sequenciamento e a filogenia foram bastante informativos e conclusivos. O alinhamento entre as sequências da região ITS (Figura 37) dessas amostras e da sequência referencial obtida no NCBI (JQ766940.1) e o agrupamento observado na figura 38 com alto valor de *bootstrap* fornecem evidências suficientes para a identificação dessas amostras como pertencentes à família Notocotylidae. A sequência utilizada como referência para a identificação dessas amostras pertence à espécie *Notocotylus malhamensis* e foi obtida por Boyce e colaboradores (2012). Essa etapa possibilitou, assim, a identificação pela primeira vez de mais três amostras de cercárias depositadas na Fiocruz-CMM.

A amostra 17278, identificada como pertencente à família Echinostomatidae através das análises morfológicas e moleculares (PCR convencional e PCR multiplex), agrupou-se com a família Diplostomidae na filogenia por sequências de parte do gene 18S. O valor de *bootstrap* no ramo que a agrupa com a sequência referencial da família Diplostomidae é alto, porém as diferenças morfológicas entre essas famílias são bastante evidentes e inconfundíveis entre si. Assim, a identificação dessa amostra passou a ser classificada como inconclusiva até que novas análises sejam feitas. Além disso, iremos realizar o resequenciamento desta amostra para eliminar a possibilidade de contaminação da amostra.

Das 21 amostras de cercárias depositadas na Fiocruz-CMM que tiveram parte do gene 18S e a região ITS sequenciada, 18 (85,71%) tiveram um resultado concordante com o que foi obtido por todas as técnicas utilizadas neste estudo (análises morfológicas, PCR convencional e/ou PCR multiplex), três (14,28%) pertencentes à família Notocotylidae foram identificadas pela primeira vez após esta etapa, uma (4,76%) teve o resultado discordante de apenas uma das técnicas (concordante com a morfologia) e uma (4,76%) teve o resultado discordante de todas as técnicas.

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.380)

```

Notocotylidae  -----gactgcatgtgcggtcaccggcggtgcctatcccgggtagactttgaaccaa
18040         gaactggactgcatgtgcggtcaccggcggtgcctatcccgggtagactttgaaccaa
18042         gaactggactgcatgtgcggtcaccggcggtgcctatcccgggtagactttgaaccaa
18044         gaactggactgcatgtgcggtcaccggcggtgcctatcccgggtagactttgaaccaa
                *****

Notocotylidae  aattcctttcatctgggtgactggatggttgaatgtacaactctgagcgggtagactcact
18040         aattcctttcatctgggtgaccagatggttgaacgtacaactctgagcgggtagactcact
18042         aattcctttcatctgggtgaccagatggttgaacgtacaactctgagcgggtagactcact
18044         aattcctttcatctgggtgaccagatggttgaacgtacaactctgagcgggtagactcact
                *****

Notocotylidae  cggctcgtgtgctgatgaagagtgcagccaactgtgtgaattaatgtgaactgcttactg
18040         cggctcgtgtgctgatgaagagtgcagccaactgtgtgaattaatgtgaactgcttactg
18042         cggctcgtgtgctgatgaagagtgcagccaactgtgtgaattaatgtgaactgcttactg
18044         cggctcgtgtgctgatgaagagtgcagccaactgtgtgaattaatgtgaactgcttactg
                *****

Notocotylidae  ctttgaacatcgacatcttgaacgcacattgcgggccacgggttagctcgtggccacgcct
18040         ctttgaacatcgacatcttgaacgcacattgcgggccacgggttagctcgtggccacgcct
18042         ctttgaacatcgacatcttgaacgcacattgcgggccacgggttagctcgtggccacgcct
18044         ctttgaacatcgacatcttgaacgcacattgcgggccacgggttagctcgtggccacgcct
                *****

Notocotylidae  gtccgagggtcggcttataaaactatcacgacgccc aaatagtcgtggattggattttgcc
18040         gtccgagggtcggcttataaaactatcacgacgccc aaatagtcgtggattggattttgcc
18042         gtccgagggtcggcttataaaactatcacgacgccc aaatagtcgtggattggattttgcc
18044         gtccgagggtcggcttataaaactatcacgacgccc aaatagtcgtggattggattttgcc
                *****

Notocotylidae  agctggcgtgatttctctgtgttaatttgcagctgaggtgccagatcaatggctttttc
18040         agctggcgtgatttctctgtgttaatttgcagctgaggtgccagatcaatggctttttc
18042         agctggcgtgatttctctgtgttaatttgcagctgaggtgccagatcaatggctttttc
18044         agctggcgtgatttctctgtgttaatttgcagctgaggtgccagatcaatggctttttc
                *****

Notocotylidae  ccaatgtactcgagcacaaccacttctgtgctggggcagcggatgaggggtgttgcgataga
18040         ccaaggtactcgagcacaaccacttctgtgctggggcagcggatgaggggtgttgcgataga
18042         ccaaggtactcgagcacaaccacttctgtgctggggcagcggatgaggggtgttgcgataga
18044         ccaaggtactcgagcacaaccacttctgtgctggggcagcggatgaggggtgttgcgataga
                *****

Notocotylidae  gtcgtggctcaatggtatatagcatgtaaaagcacgttctatcaatatactttctctgtc
18040         gtcgtggctcaatggtatatagcatgtaaaagcacgttctatcgatataccttctctgtc
18042         gtcgtggctcaatggtatatagcatgtaaaagcacgttctatcgatataccttctctgtc
18044         gtcgtggctcaatggtatatagcatgtaaaagcacgttctatcgatataccttctctgtc
                *****

Notocotylidae  cgctagaatggatggtggcaatgtgtttgccctatacctgtgactgttaa
18040         cgctagaatggatggtggcaatgtgtttgccctgtacctgtgactgtct--
18042         cgctagaatggatggtggcaatgtgtttgccctgtacctgtgactgtct--
18044         cgctagaatggatggtggcaatgtgtttgccctgtacctg-gactgtct--
                *****

```

Figura 37: Alinhamento obtido entre amostras sequenciadas neste estudo (18040, 18042 e 18044) e amostra referência para família Notocotylidae obtida no NCBI (JQ766940.1).

7 Situação atual da identificação das cercarias obtidas na Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM)

Anteriormente à realização deste trabalho, 30,8% das cercarias depositadas na coleção estavam identificadas e 69,2% das cercarias estavam sem identificação. Após as análises morfológicas e moleculares realizadas neste estudo (PCR convencional, PCR multiplex e sequenciamento nucleotídico), 63,52% do acervo de cercarias da Fiocruz-CMM foi identificado conforme descrito na tabela 12. Trinta e quatro amostras (40%) das cercarias foram identificadas em nível de família pela primeira vez, 15 amostras (17,64%) tiveram sua identificação prévia confirmada, duas amostras (2,35%) tiveram sua identificação corrigida e três amostras (3,52%) tiveram sua identificação inconclusiva uma vez que os resultados das análises morfológicas e moleculares foram divergentes entre si. Parte do acervo permaneceu não identificada (28 amostras-32,95%) e três amostras (3,52%) não foram identificadas neste estudo (amostras 16757, 17266 e 17268), mantendo a identificação realizada no Moluscário Lobato Paraense (Figura 38).

Tabela 12- Situação atual da identificação de cercarias depositadas na Fiocruz-CMM

Código da Amostra	Identificação Prévia Moluscário Lobato Paraneze	Resultado das Análises Morfológicas	Resultado da PCR Específica	Resultado da PCR Multiplex	Resultado do Sequenciamento		Categoria
					18S	ITS	
8164	Ocelifera	N/A	Clinostomidae	Clinostomidae	Clinostomidae	Clinostomidae	Confirmado
14289	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	N/A	N/A	Confirmado
14290	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	N/A	N/A	Confirmado
14301	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Confirmado
14303	<i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	Schistosomatidae	N/A	Schistosomatidae	Confirmado
14532	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	Strigeidae	Clinostomidae	N/A	Strigeidae	Strigeidae	Inconclusiva
14558	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
14560	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
14562	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
14569	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado

14575	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
14577	Cercaria com cauda bifurcada	N/A	Strigeidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
14655	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
14700	Cercaria com cauda bifurcada	N/A	Schistosomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
14702	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Echinostomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
14762	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
14806	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
14820	Com cauda bifurcada; não é <i>S. mansoni</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
15067	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	N/A	N/A	N/A	Confirmado
15069	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Echinostomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez

15071	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
15087	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Schistosomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
15089	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
15091	Cercaria	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
15160	Macrogranulosa	N/A	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	N/A	Confirmado
15162	Caratinguensis	N/A	Clinostomidae	N/A	N/A	N/A	Corrigido
15164	Macrogranulosa	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
15167	Cercária	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
15169	Ocelífera	Schistosomatidae	Schistosomatidae	Schistosomatidae	N/A	Schistosomatidae	Corrigido
15171	Macrogranulosa	N/A	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	N/A	Confirmado
15244	Cercaria com cauda bifurcada, não é <i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
15246	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Echinostomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez

16498	Com cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
16499	Com cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
16599	Cercária	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
16600	Cercaria	N/A	Strigeidae	N/A	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
16737	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	Echinostomatidae	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
16738	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	Identificado pela primeira vez
16757	<i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Identificação mantida
16758	Com cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
16759	Cercaria com cauda bifurcada	Strigeidae	Strigeidae	Strigeidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
16760	Cercaria com cauda bifurcada	Echinostomatidae	Strigeidae	N/A	N/A	N/A	N/A	Inconclusivo
16761	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Confirmado
16805	Cercaria sem cauda bifurcada	N/A	Strigeidae	N/A	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez

17272	<i>Caratinguensis</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
17274	<i>Macrogranulosa</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
17276	Macrogranulosa	N/A	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	N/A	N/A	Confirmado
17278	Macrogranulosa	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	Diplostomidae	N/A	N/A	Inconclusivo
17447	Cercária	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
17449	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
17494	Cercária	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
17496	Cercaria	N/A	Echinostomatidae	N/A	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
17497	<i>Caratinguensis</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
17595	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae/ Schistosomatidae	Echinostomatidae/ Schistosomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
17597	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez
17599	Cercaria com cauda bifurcada	Diplostomidae	N/A	N/A	Diplostomidae	Diplostomidae	N/A	Outras famílias
17601	Cercaria sem cauda bifurcada	Echinostomatidae	Echinostomatidae	Echinostomatidae	N/A	N/A	N/A	Identificado pela primeira vez

17650	<i>Schistosoma mansoni</i>	N/A	Schistosomatidae	Schistosomatidae	N/A	Schistosomatidae	Confirmado
17947	Com cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Não identificado
18040	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	Notocotylidae	Identificado pela primeira vez
18042	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	Notocotylidae	Identificado pela primeira vez
18044	Sem cauda bifurcada	N/A	N/A	N/A	N/A	Notocotylidae	Identificado pela primeira vez

N/A: não se aplica

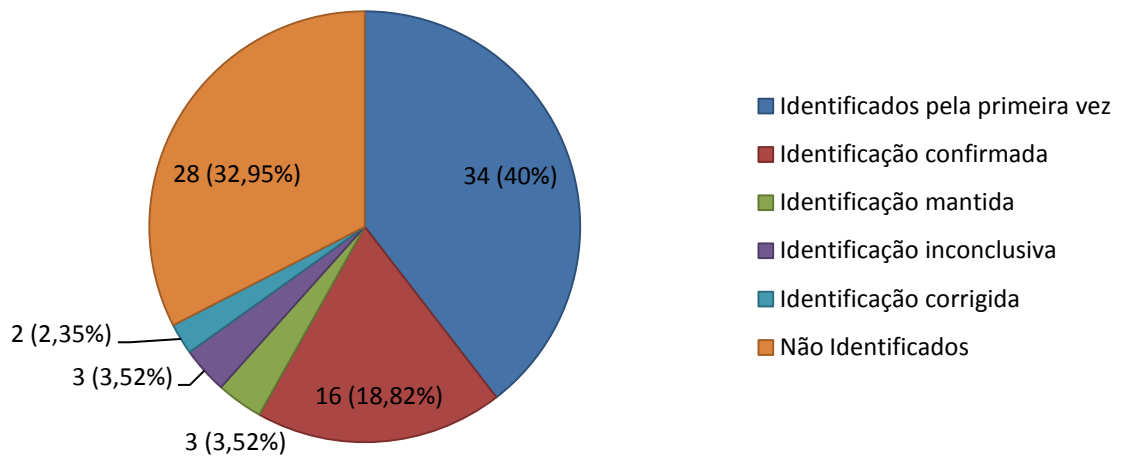


Figura 38: Representação gráfica da situação atual da identificação de cercarias depositadas na Fiocruz-CMM.

Após a realização deste trabalho, a Fiocruz-CMM passou a contar com 55 amostras (64,67%) de cercarias identificadas em nível de família, sendo então composta por 23 amostras (27,05%) pertencentes à família Schistosomatidae, 13 (15,29%) à família Echinostomatidae, 11 (12,94%) à família Strigeidae, três (3,52%) à família Notocotylidae, duas (2,35%) à família Clinostomidae, uma (1,17%) à família Diplostomidae, uma (1,17%) coinfeção entre Echinostomatidae e Schistosomatidae, três (3,52%) com identificação inconclusiva e 28 (32,95%) não identificadas (Figura 39).

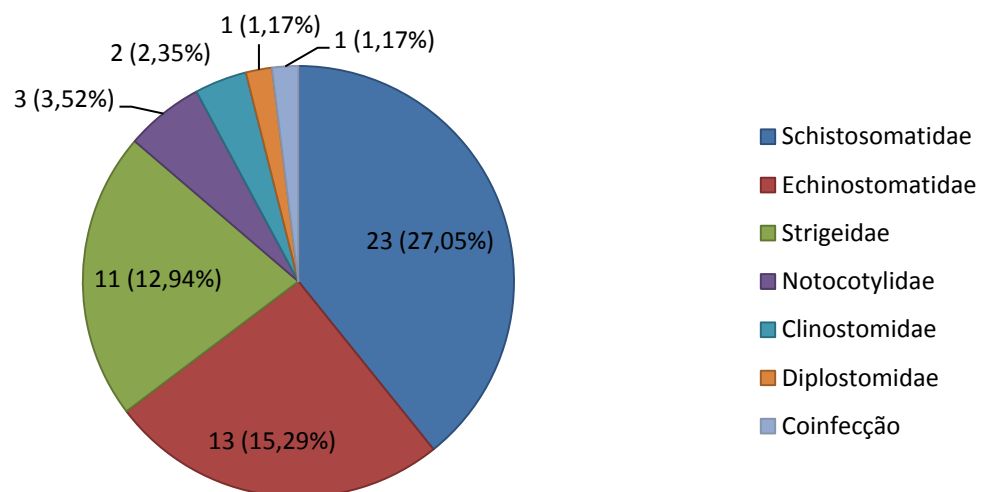


Figura 39: Representação gráfica dos resultados obtidos neste trabalho após análises morfológicas e moleculares agrupados por famílias.

Moluscos do gênero *Biomphalaria* possuem grande importância epidemiológica no Brasil uma vez que as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* são hospedeiras intermediárias do trematódeo *S. mansoni*, agente etiológico da esquistossomose mansoni. A distribuição dessas espécies de moluscos ao longo do território brasileiro vem sendo estudada e constantemente atualizada. É importante conhecer a distribuição territorial de espécies que atuam como hospedeiros intermediários uma vez que sua distribuição tende a sobrepor por aquela dos parasitos por elas transmitidos. Além disso, o conhecimento da distribuição geográfica dos hospedeiros auxilia na tomada de medidas preventivas à introdução ou expansão de doenças em determinadas áreas (BRASIL, 2014). No contexto brasileiro, é crucial conhecer a distribuição não apenas das três espécies hospedeiras de *S. mansoni*, mas também das demais espécies pertencentes ao gênero *Biomphalaria* uma vez que elas também atuam como hospedeiras intermediárias de outros trematódeos que podem causar impactos na saúde humana através de infecções acidentais, na saúde animal e na economia. Pouco se sabe ainda sobre a distribuição desses trematódeos no Brasil, além de sua presença detectada em estudos pontuais, como o estudo de Pinto em 2013 na região da Lagoa da Pampulha em Belo Horizonte/MG. Menos ainda se sabe sobre ocorrência no país das parasitoses por eles causadas, sobretudo, as infecções acidentais em humanos, como é o caso da dermatite cercariana.

Coleções biológicas podem ser consideradas como um retrato da biodiversidade, além de atuarem como fontes de estudo sobre taxonomia, distribuição e diversidade. Algumas medidas são indispensáveis para uma coleção biológica como: investimentos na manutenção da coleção, fixação e preservação adequada do acervo, correta identificação taxonômica, qualidade das informações associadas aos exemplares depositados e disponibilidade do material e dessas informações à comunidade científica (FIOCRUZ, 2017). A Coleção de Malacologia Médica vem sistematicamente buscando atender a esses requisitos. Ela foi fundada em 1993 e desde então, aprimorou não apenas o seu espaço físico, mas o conhecimento relacionado às técnicas de conservação e identificação do material biológico nela depositado. No ano 2008, foi incorporada à rotina da coleção a utilização de técnicas moleculares associadas às morfológicas para a identificação dos moluscos do gênero *Biomphalaria* (CARVALHO et al., 2008). Em 2012, Aguiar-Silva realizou uma retificação da identificação dos moluscos pertencentes a esse gênero através de técnicas morfológicas e moleculares. Seu estudo foi de grande importância uma vez que confirmou a identificação de 54,1% dos moluscos do gênero *Biomphalaria* depositados na coleção, identificou pela primeira vez 19,5% e corrigiu a identificação de 4,1% do acervo. Entretanto, 3,4% dos

moluscos não foram identificados devido à degradação do material e 18,9% permaneceram com identificação inconclusiva indicando a necessidade de maiores estudos taxonômicos para o grupo. Em 2014(a), Carvalho realizou uma retificação através de técnicas morfológicas dos moluscos da família Lymneidae que identificou em nível de espécie 100% dos moluscos pertencentes a esta família. Estudos como esses são de grande importância, pois contribuem para a melhoria da qualidade da identificação do acervo e promovem atualização das técnicas e procedimentos realizados na coleção. A detecção de problemas associados ao processo de fixação e preservação do material, como foi observado por Aguiar-Silva, reforçam a necessidade dessas atualizações metodológicas.

O presente estudo reavaliou a identificação das larvas de trematódeos liberadas pelos moluscos do gênero *Biomphalaria* depositados na Fiocruz-CMM através de técnicas morfológicas e moleculares. A identificação prévia dessas larvas foi realizada pelo Moluscário Lobato Paraense no momento do exame parasitológico dos moluscos para verificação da infecção por *S. mansoni*. Apenas as cercarias pertencentes a essa espécie foram identificadas em nível específico. Os caracteres de cercarias de *S. mansoni* são facilmente identificados em microscópio estereoscópio e são eles: presença de cauda bifurcada, brevifurcada, ausência de faringe e ocelos, movimento ativo em forma de 8 e enrolamento característico da furca quando em repouso (CARVALHO et al, 2014b). As demais cercarias eram caracterizadas por tipo cercariano ou de acordo com algumas características morfológicas como tipo de cauda (simples ou bifurcada). O avanço na identificação desses exemplares era impossibilitado pela ausência de profissionais especialistas no grupo e por limitações metodológicas associadas à taxonomia dos trematódeos em estágios larvais.

A taxonomia das larvas de trematódeos é bastante complicada e restrita. Dificilmente as cercarias são identificadas em nível específico através de técnicas morfológicas uma vez que apresentam tamanho reduzido, caracteres morfológicos difíceis de serem observados, alta similaridade dos caracteres entre organismos muito próximos, morfologia muito diferente em relação ao estágio adulto e ausência de profissionais capacitados e experientes para a realização dessas análises (NOLAN; CRIBB, 2005). Assim, a taxonomia clássica pode não ser muito informativa de forma que as larvas de trematódeos na maioria das vezes são identificadas apenas quanto ao tipo cercariano, categoria que em alguns casos pode ser associada à família a qual o trematódeo pertence. Raramente a morfologia das cercarias permite a identificação de gênero ou espécie. Para que seja feita a identificação específica do exemplar, é necessário o desenvolvimento experimental do seu ciclo biológico para obtenção do parasito na fase adulta. O ciclo biológico dos trematódeos, em geral, é bastante complexo

envolvendo uma grande diversidade de possíveis hospedeiros. As dificuldades metodológicas para o desenvolvimento experimental do ciclo biológico de um trematódeo apontam para a necessidade de novas técnicas auxiliares à taxonomia clássica. Nesse sentido, marcadores moleculares surgem como uma alternativa atrativa para auxiliar na solução dessas dificuldades. A obtenção de sequências nucleotídicas, definição de marcadores moleculares e desenvolvimento de métodos diagnósticos se mostram cada vez mais relevantes para um estudo mais completo sobre os trematódeos em qualquer estágio do seu ciclo de vida.

A escolha do marcador molecular é uma etapa que requer muita atenção. Tanto o genoma nuclear quanto o mitocondrial acumulam mutações ao longo do tempo, entretanto, algumas regiões do genoma apresentam maior número de polimorfismos que outras. Hillis e Dixon (1991) sugerem que, para estudos de sistemática e taxonomia, não é adequada utilização de marcadores moleculares de evolução rápida, e sim, aqueles que apresentam mais de 70% e menos de 100% de identidade na sequência nucleotídica entre as espécies. Uma vez delimitado o objetivo do estudo e levando em conta essas variáveis acerca da taxa de mutação dos genes, a escolha do marcador também deve se basear em estudos prévios realizados com organismos evolutivamente próximos e na disponibilidade de sequências para comparações. O DNA ribossomal é atualmente o marcador mais utilizado para estudos de sistemática e taxonomia de trematódeos (NOLAN; CRIBB, 2005). Além disso, por ser uma região amplamente estudada, possui o maior número de sequências depositadas em bancos de dados públicos, como o NCBI. O presente trabalho se propôs a identificar marcadores moleculares para o desenho de um painel de iniciadores capazes de diferenciar as famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae, que sabidamente são encontradas na região neotropical parasitando moluscos do gênero *Biomphalaria*. A escolha da região do rDNA como marcador molecular alvo deste estudo se baseou nos dados obtidos da literatura quanto a sua eficácia para estudos taxonômicos apresentando menor taxa de evolução que os genes mitocondriais e na maior disponibilidade de sequências depositadas no NCBI. Atualmente o número de genomas de trematódeos totalmente sequenciados é muito baixo, sendo 13 genomas nucleares (8 Schistosomatidae, 2 Opisthorchiidae, 1 Fasciolidae, Dicrocoelidae, Echinostomatidae) e 28 genomas mitocondriais (5 Paramphistomidae, 3 Troglotmatiae, Schistosomatidae e Fasciolidae; 2 Opisthorchiidae, Gastrothylacidae, Dicrocoeliidae e Heterophyidae; 1 Echinochasmidae, Gastrodiscidae, Bachycladiidae, Echinostomatidae, Notocotylidae e Clinostomidae). A escassez de dados genômicos e de sequências gênicas disponíveis é um fator limitante para os estudos moleculares do grupo. Apesar de estar bem estabelecido o uso do rDNA para análises taxonômicas, filogenéticas e outros estudos

moleculares de trematódeos (BLASCO-COSTA et al., 2016), o sequenciamento de genes e genomas é uma etapa necessária que, num futuro próximo, pode proporcionar dados ainda melhores para análises moleculares.

Utilizando como entrada todas as sequências do rDNA de espécies pertencentes às famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae depositadas no NCBI, a ferramenta online TipMT, que foi desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa (RODRIGUES-LUIZ et al., 2017), foi capaz de desenhar 17 pares de iniciadores que amplificam regiões conservadas em nível de família. Todos os pares de iniciadores foram testados e quatro deles apresentaram um melhor desempenho, sendo eles: (1) Clin 4F/ Clin 4R, específicos para a família Clinostomidae, gerando um fragmento de 115pb; (2) Echi 1F/ Echi 1R, específicos para a família Echinostomatidae, gerando um fragmento de 172pb; (3) Schis 2F/ Schis 2R, específicos para a família Schistosomatidae, gerando um fragmento de 140pb; (4) Strig 5F/ Strig 5R, específicos para a família Strigeidae, gerando um fragmento de 183pb. Cada par de iniciador foi individualmente testado para padronização em PCR convencional a uma temperatura de anelamento (TM) de 62,5°C utilizando como molde para a reação 10ng de DNA genômico das quatro famílias, de outras famílias de trematódeos e do nematódeo *A. cantonensis* e de diferentes espécies de *Biomphalaria* spp. presentes no Brasil. Todos os iniciadores se mostraram específicos, amplificando apenas as amostras de cada família alvo. A sensibilidade dos iniciadores foi avaliada utilizando diluições seriadas das amostras de DNA de 10ng a 1da. Os iniciadores se mostraram sensíveis a uma faixa de 0,1 ng a 1ag de DNA por reação. Além disso, os iniciadores também foram capazes de detectar a presença de DNA de cada família em uma simulação de coinfeção e também, os iniciadores para a família Schistosomatidae detectaram a presença de DNA de *S. mansoni* em amostras de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados. Após o processo de padronização, os iniciadores foram utilizados para uma reação de PCR multiplex onde todos eles foram incluídos em uma mesma reação sob as mesmas condições (0,25µM/ul de iniciador; TM= 62,5°C) utilizando como molde para a reação 50ng de amostras de DNA das quatro famílias, de outras famílias de trematódeos e do nematódeo *A. cantonensis* e de diferentes espécies de *Biomphalaria* spp. presentes no Brasil. Mais uma vez a técnica se mostrou eficaz na detecção e separação das famílias Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae, além de ser também eficaz para a detecção da presença de DNA de cada uma família em uma simulação de coinfeção. Este foi um passo inovador, uma vez que não foi ainda desenvolvida uma técnica capaz de identificar e diferenciar essas quatro famílias. A taxonomia molecular em nível de família fornece importantes informações sobre a diversidade da fauna de

trematódeos, direciona para os prováveis hospedeiros e os tipos de impactos causados pelos parasitos na região da coleta possibilitando assim o delineamento de melhores estratégias de controle desses parasitos. Além de ser um diagnóstico diferencial rápido e preciso entre as principais famílias de trematódeos transmitidas por *Biomphalaria*.

Anteriormente à realização deste trabalho, somente 16,47% das cercarias depositadas na coleção estavam identificadas até espécie, sendo todas elas *S. mansoni*, 14,32% identificadas quanto ao tipo cercariano (2,35% cercaria ocelífera, 4,7% cercaria caratinguensis e 7,05% cercaria macrogranulosa) e 69,41% das cercarias depositadas estavam sem nenhuma identificação. A combinação das análises morfológicas e moleculares realizadas neste estudo possibilitou a identificação de 63,52% das cercarias depositadas na Fiocruz-CMM até o nível de família. O acervo passou a ser classificado então da seguinte forma: 27,05% da cercarias família Schistosomatidae, 15,29% da família Echinostomatidae, 12,94% da família Strigeidae, 3,52% da família Notocotylidae, 2,35% da família Clinostomidae, 1,17% da família Diplostomidae, 1,17% de coinfeção entre Echinostomatidae e Schistosomatidae, 3,52% tiveram sua identificação inconclusiva, e 32,94% do acervo permaneceu sem identificação.

Era esperado que o número de cercarias pertencente à família Schistosomatidae fosse maior uma vez que a Fiocruz-CMM está vinculada ao SNRE e parte das cercarias já haviam sido anteriormente identificadas como *S. mansoni*. Das 23 amostras pertencentes à família Schistosomatidae, 15 foram identificadas morfolologicamente como *S. mansoni*. Pelo uso de técnicas morfológicas e/ou moleculares, foram identificadas pela primeira vez oito cercarias da família Schistosomatidae que não são da espécie *S. mansoni*, mas são esquistossomatídeos de aves potencialmente causadores da dermatite cercariana. São amostras coletadas nos estados de Minas Gerais (Almenara, Itamarandiba, Materlândia, Rio do Prado, Rubim e Santa Maria do Salto) e Rio de Janeiro (Itacoatiara). Nestas localidades, recomenda-se maior atenção quanto ao risco de ocorrência e expansão da dermatite cercariana, sobretudo em locais onde há cachoeiras e rios com possibilidade de ecoturismo e atividades de lazer.

Mais de 60% das cercarias previamente identificadas como macrogranulosa pelo Moluscário Lobato Paraense foram identificadas molecularmente neste estudo como pertencentes à família Echinostomatidae. Schell (1970) definiu que cercarias macrogranulosas pertenciam à família Psilostomidae. Tkach e colaboradores (2015), após um estudo de filogenia e sistemática molecular baseada no gene 28S, agruparam a subfamília Ribeiroiinae (que anteriormente pertencia à família Psilostomidae) à família Echinostomatidae. Os resultados de Tkach e colaboradores confirmam a possibilidade das amostras de cercarias macrogranulosas citadas acima sejam de fato pertencentes à família Echinostomatidae.

Entretanto, novas coletas em Almenara/MG (-40.68361; -16.16043), Betim/MG (-44.098812; -19.968967) e Belo Horizonte/MG (-43.97691; -18.85822) para novos estudos podem contribuir na busca de maiores evidências experimentais que confirmam essa hipótese.

Previamente a este estudo, a coleção contava com duas cercarias identificadas como ocelífera. Este tipo cercariano é associado à família Clinostomidae e caracteriza-se pela presença de cauda bifurcada, faringe, ocelos pigmentados e crista (RUIZ, 1953). A presença do ocelo pigmentado pode levar a uma confusão no momento das análises morfológicas da amostra, uma vez que algumas cercarias da família Schistosomatidae (como os esquistossomatídeos de aves) também apresentam esta característica. Entretanto, esquistossomatídeos são afaringeados e não possuem crista. Uma das amostras previamente identificada como cercaria ocelífera na verdade pertencia à família Schistosomatidae, o que foi evidenciado tanto pelas análises morfológicas, quanto moleculares. Sua identificação foi corrigida. A outra cercaria previamente identificada como ocelífera teve sua identificação confirmada como pertencente à família Clinostomidae, sendo atualmente a única amostra depositada na Fiocruz-CMM desta família.

Entre as quatro cercarias previamente identificadas como *caratinguensis*, apenas uma foi identificada a partir de técnicas moleculares como pertencente à família Clinostomidae. Sua identificação foi corrigida. Entretanto, este tipo cercariano está associado à família Strigeidae (JANNOTTI-PASSOS et al., 2008) e, por isso, recomenda-se nova coleta na região de Almenara/MG (-40.68361; -16.16043) a fim de confirmar o resultado aqui obtido. As outras três cercarias do tipo *caratinguensis* não foram identificadas. As amostras identificadas como pertencentes à família Strigeidae foram, em sua totalidade, identificadas pela primeira vez neste estudo.

Casos de coinfeção entre trematódeos já foram relatados ocorrendo naturalmente (BASCH, 1991; SANDLAND et al, 2007) e experimentalmente (DREYFUSS et al., 2016). A taxa de ocorrência de coinfeção natural por miracídios de diferentes espécies é relativamente baixa e raramente o ciclo biológico desses parasitos é completado até a eliminação de cercarias (BORN-TORRIJOS, et al., 2014). Os recursos do hospedeiro são limitados e a própria competição entre as espécies por esses recursos leva à eliminação de uma delas (THIELE; MINCHELLA, 2013). Durante as análises moleculares deste estudo, detectou-se um caso de coinfeção. Após o exame de infectividade do molusco realizado no Moluscário Lobato Paraense, as cercarias liberadas foram classificadas como “cercaria de cauda não bifurcada”. Nas análises morfológicas realizadas neste estudo, foram observados caracteres que remetem à família Echinostomatidae, como a cauda simples e a presença de colar de

espinhos na ventosa oral. Entretanto, as análises moleculares (PCR e PCR multiplex) detectaram a coinfeção entre as famílias Schistosomatidae e Echinostomatidae. Levando em consideração que a coinfeção não foi detectada durante o exame do molusco e tampouco durante as análises morfológicas, acredita-se então nas seguintes possibilidades: (1) houve de fato a coinfeção, porém o trematódeo da família Schistosomatidae não se encontrava na forma evolutiva de cercaria e, assim, não foi eliminado pelo molusco impossibilitando a identificação morfológica; (2) houve de fato a coinfeção e o número de cercarias maduras pertencentes à família Echinostomatidae liberadas foi significativamente maior que as larvas de Schistosomatidae, o que pode ter influenciado no momento da identificação morfológica; (3) houve contaminação da amostra em algum momento ao longo do processo de recebimento do molusco até o seu depósito na coleção. Para confirmar a ocorrência de coinfeção natural, novas coletas poderão ser realizadas na região de coleta desta amostra, em Betim/MG (-19.54075; -44.145280).

A identificação de três amostras permaneceu inconclusiva. Em uma amostra (16760) houve resultados diferentes após as análises morfológicas e moleculares realizadas neste estudo. Considerando que a amostra utilizada para as análises morfológicas não estava em bom estado, optou-se por manter a identificação inconclusiva até que sejam realizadas novas coletas na região de Santana do Riacho/MG (Povoado Curral Queimado, Sítio do Sr. Zé Sabino). A amostra 14532 que apresentou resultados divergentes entre análises morfológicas e moleculares teve seu resultado dado como inconclusivo. Pela filogenia baseada na região ITS, essa amostra foi agrupada a uma amostra identificada como Diplostomidae. Já pela filogenia baseada em parte do gene 18S, a amostra 14532 em um ramo isolado e próximo às amostras da família Strigeidae. Em ambas, o valor de *bootstrap* não foi alto (705 e 765, respectivamente) não sendo suficiente para solucionar o problema de identificação desta amostra. Dessa forma, essa amostra permanece com a identificação inconclusiva. A amostra 17278 foi identificada neste estudo como pertencente a família Echinostomatidae após as análises morfológicas e moleculares por PCR convencional e PCR multiplex. Entretanto, com alto valor de *bootstrap*, esta amostra agrupou-se à amostra 17599 (identificada como pertencente à família Diplostomidae) na filogenia por sequências de parte do gene 18S. Os caracteres morfológicos que separam essas famílias são bastante distintos e inconfundíveis entre si, porém, o resultado observado na filogenia aponta para a necessidade de uma avaliação mais criteriosa do exemplar. Essa amostra passou a ser incluída na categoria de identificação inconclusiva até que sejam realizadas novas análises morfológicas e novo sequenciamento da amostra para a realização de novas análises filogenéticas.

As amostras 18040, 18042 e 18044, que não foram identificadas através de técnicas morfológicas ou moleculares (PCR convencional e PCR multiplex) neste estudo, apresentaram alta identidade com sequências da família Notocotylidae após a busca por similaridades no Blast. O alinhamento entre essas sequências e a sequência referência de *Notocotylus malhamensis* (NCBI- JQ766940.1) e o agrupamento observado entre elas na árvore filogenética gerada a partir de sequências da região ITS sugerem fortemente que essas amostras pertencem a família Notocotylidae.

Cerca de 33% do acervo de cercarias permanece sem identificação, o que pode ser explicado por: (1) processo inadequado de fixação do material, impossibilitando a identificação morfológica de alguns exemplares, (2) degradação do DNA obtido a partir do material criopreservado impossibilitando a identificação por técnicas moleculares, (3) o material pode pertencer à outra família de trematódeo que o painel de iniciadores desenhados nesse estudo não abrange.

Quando utilizadas amostras criopreservadas de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados com trematódeos como molde para análises moleculares, apenas 29,62% foram identificadas. Este resultado demonstra a necessidade de maiores estudos utilizando como molde para a reação amostras de moluscos infectados para afirmar a eficácia dos iniciadores desenhados neste estudo para a detecção da infecção.

Além da identificação das amostras cedidas pela Fiocruz-CMM, este trabalho realizou o sequenciamento nucleotídico de parte do gene 18S em 18 amostras, das regiões ITS 1 e 2 do rDNA em 25 amostras, e de parte do gene COI do mtDNA em 12 amostras, como uma forma de contribuir para o avanço do conhecimento taxonômico de trematódeos. Essas sequências serão depositadas em bancos de dados públicos e disponibilizadas para consulta. Devido a problemas no alinhamento das sequências do gene COI, este foi retirado das análises. O alinhamento das sequências parciais do gene 18S e da região ITS será utilizado na busca de polimorfismos que permitam aumentar a resolução do painel de iniciadores para o nível de gênero ou espécies. As árvores geradas a partir das sequências de ITS e parte de 18S agruparam a maioria das amostras da mesma família em ramos mais próximos, como já era esperado. A disposição dos clados por família variou entre as árvores, porém as famílias Strigeidae e Displostomidae estiveram proximamente relacionadas em ambas. Em alguns nós o valor de *bootstrap* foi mais baixo do que o recomendado na literatura (70%- HILLIS; BULL, 1993; 95%- LI, 1997). Para uma análise mais robusta da relação filogenética entre famílias de trematódeos, se faz necessário o sequenciamento de um maior número de amostras e de outros marcadores moleculares.

Faltýnková e colaboradores (2016) afirmaram a importância da associação entre a taxonomia clássica por técnicas morfológicas e a utilização de técnicas moleculares. Existe, de fato, uma tendência ao uso de marcadores moleculares como foi observado na revisão realizada por Blasco-Costa e colaboradores (2016). O presente estudo segue essa tendência e reforça a importância dos marcadores moleculares como técnica complementar à taxonomia clássica uma vez que 27 das 55 amostras atualmente identificadas tiveram sua identificação definida somente após as análises moleculares. Além de ter sido um estudo pioneiro na Fiocruz-CMM, é importante ressaltar que a parceria firmada entre a UFMG e Fiocruz através deste trabalho não apenas contribuiu para a identificação de parte do acervo da coleção, como também gerou a produção de um Procedimento Operacional Padrão (POP), um documento oficial interno do IRR-Fiocruz, para definir e padronizar as técnicas de fixação e preservação de cercarias na coleção. Esse foi um passo de extrema importância uma vez que garante a qualidade dos materiais biológicos que, a partir de 2017, serão recebidos e depositados. Foi também realizada a capacitação técnica do pessoal responsável pela execução desses procedimentos. Por fim, como forma de contribuir para o conhecimento sobre a taxonomia da Classe Trematoda, foi depositada um pedido de patente da utilização da PCR multiplex como método para diagnóstico diferencial entre famílias de Trematódeos cuja titularidade pertence à UFMG e Fiocruz (Anexo 2).

- A associação entre técnicas morfológicas e moleculares é capaz de solucionar problemas taxonômicos para a identificação de trematódeos em qualquer estágio do seu ciclo evolutivo.
- A região do DNA ribossomal é um bom marcador molecular a ser utilizado para estudos em nível de família.
- A ferramenta TipMT foi útil na identificação e desenho automático dos iniciadores utilizados neste trabalho a partir de um número muito limitado de sequências de trematódeos disponíveis em banco de dados públicos.
- A escassez de dados genômicos depositados em banco de dados públicos é um fator limitante para os estudos moleculares de trematódeos. A obtenção de novas sequências de qualidade é necessária e deve ser estimulada.
- Um processo adequado de fixação e preservação do acervo de uma coleção biológica é fator determinante para o acesso e estudo desse material.
- A técnica desenvolvida neste estudo possibilitou um aprimoramento na identificação das cercarias da Fiocruz-CMM.

AGUIAR-SILVA, C. **Avaliação e retificação da identificação específica de moluscos do gênero *Biomphalaria* PRESTON, 1910 do acervo da Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM)**. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2012.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, p. 403-410, 1990.

BASCH, P.F. **Schistosomes: Development, Reproduction, and Host Relations**. Oxford University Press. New York, 1991.

BLASCO-COSTA, I.; POULIN, R.; PRESSWELL, B. Species of *Apatemon* Szidat, 1928 and *Australapatemon* Sudarikov, 1959 (Trematoda: Strigeidae) from New Zealand: linking and characterising life cycle stages with morphology and molecules. **Parasitology Research**, v.115, n. 271, 2016a. doi:10.1007/s00436-015-4744-0

BLASCO-COSTA, I.; CUTMORE, S.C.; MILLER, T.L.; NOLAN, M.J. Molecular approaches to trematode systematic: ‘best practice’ and implications for future study. **Systematic Parasitology**. v. 93, p. 295-306. 2016b. doi:10.1007/s11230-016-9631-2

BORN-TORRIJOS, A. et al. Estimating trematode prevalence in snail hosts using a single-step duplex PCR: how badly does cercarial shedding underestimate infection rates? **Parasites Vectors**. v.7, 2014.

BOYCE, K.; HIDE, G.; CRAIG, P.S.; REYNOLDS, C.; PICKLES, A.; ROGAN, M.T. Identification of a new species of digenean *Notocotylus malhamensis* n. sp. (Digenea: Notocotylidae) from the bank vole (*Myodes glareolus*) and the field vole (*Microtus agrestis*). **Parasitology**. v.139, n.12, p.1630-39. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília, 2014.

CALDEIRA, R.L. et al. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1998; 93: 219-25.

CALDEIRA, R.L. et al. Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism of internal transcriber spacer of the RNA ribosomal gene. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2000; 95(2):171-7.

CAMPRUBÍ, D. et al. A 38-year-old woman with zosteriform skin lesions. **PLoS Neglected Tropical Disease**. v.11(11). 2017.

CARON, Y. et al. Swimmer’s Itch in Belgium: First Recorded Outbreaks, Molecular Identification of the Parasite Species and Intermediate Hosts. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**. 2017. doi: 10.1089/vbz.2016.2034

CARVALHO, C.M. **Revisão taxonômica e elaboração de mapas de distribuição geográfica de espécies brasileiras da família Lymnaeidae Rafinesque, 1815 (Gastropoda, Basommatophora)**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2014.

CARVALHO, O.S. et al. **Moluscos Brasileiros de Importância Médica**. 2. ed. Belo Horizonte, Fiocruz/Centro de Pesquisas René Rachou, 2014b.

CARVALHO, O.S.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; CALDEIRA, R.L. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. In CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. editores. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. p. 311-45.

CASTRESANA, J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. **Molecular Biology Evolution**. v.17, n.4, p.540-52. 2000

CDC-Center for Disease and Control Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/>. Acesso em 14 dez 2017.

CHUNG, D.I. et al. The first human case of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomidae) infection in Korea. **Korean Journal of Parasitology**. v.33, p219-223. 1995.

DESLANDES, N. Técnica de dissecação e exame de planorbídeos. **Revista de Serviços Especiais em Saúde Pública**. v.4, p.371-382. 1951.

DREYFUSS, G.; VIGNOLES, P.; RONDELAUD, D. *Pseudosuccinea columella*: experimental co-infections of juvenile and pre-adult snails with the digeneans *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica*. **Journal of Helminthology**. v.90, p.753-759. 2016. doi:10.1017/S0022149X15001078

ESTRADA, V.E. et al. Phylogenetics of South American *Biomphalaria* and description of a new species (Gastropoda: Planorbidae). **Journal of Molluscan Studies**. v.72, p. 221-28. 2005.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**.v.8, n.3, p.175-85. 1998.

FALTYŃKOVA, A.; SURES, F.A.; KOSTADINOVA, A. Biodiversity of trematodes in their intermediate mollusc and fish hosts in the freshwater ecosystems of Europe. **Systematic Parasitology**. v. 93, p.283-293, 2016. doi: 10.1007/s11230-016-9627-y

FIOCRUZ- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **CMM-Coleção de Malacologia Médica**. Disponível em: < <http://cmm.fiocruz.br/index> >. Acesso em 07 mar 2017.

FRIED, B.; GRACZYK, T.K.; TAMANG, L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. **Parasitology Research**. v.93, p. 159-170.2014. doi: 10.1007/s00436-004-1112-x

GRACZYK, T.K.; FRIED, B. Echinostomiasis: a common but forgotten foodborne disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 1998;58(4):501-4.

- GUINDON, S.; DELSUC, F.; DUFAYARD, J.F.; GASCUEL, O. Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. **Methods of Molecular Biology**.v.537, p.113–37. 2009.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 2.0. **Systematic Biology**.v.59, n.3, p.307–21. 2010.
- HERNÁNDEZ-MENA, D.I.; GARCÍA-PRIETO, L.; GARCÍA-VARELA, M. Morphological and molecular differentiation of *Parastrigea* (Trematoda: Strigeidae) from Mexico, with the description of a new species. **Parasitology International**, v. 63, p. 315–323, 2014.
- HILLIS, D.M.; BULL, J.J. An empirical-test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**. v.42, n.2, p.182-92. 1993.
- HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v. 66, p. 411– 426, 1991.
- HOLLAND, M.P. Echinostome-induced mortality varies across amphibian species in the field. **Journal of Parasitology**. v. 96, p.851–855. 2010.
- HOLLAND M.P.; SKELLY, D.K.; KASHGARIAN, M.; BOLDEN, S.R.; HARRISON, L.M.; CAPPELLO, M. Echinostome infection in green frogs (*Rana clamitans*) is stage and age dependent. **Journal of Zoology**. v.271,p. 455–462. 2007.
- HORÁK, P. et al. Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 28, p. 165–190, 2015. doi:10.1128/CMR.00043-14.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**. v.9, p.868-877. 1999.
- JANNOTTI-PASSOS, LK., CALDEIRA, RL., CARVALHO, OS. Técnicas utilizadas no estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria* e na manutenção do ciclo de *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 529-544. 2008. ISBN 978- 85-7541-370-8.
- JOSHI,S.K.; PHIL, M. Rice field work and the occupational hazards. **Occupational Medicine**. 4:111–114. 2002.
- JUNG S.C. et al. A case of pharyngitis caused by *Clinostomum complanatum*. **Korean Journal of Otorhinolaryngol-Head Neck Surgery**. v.58, p.61-63. 2015.
- KANE, R.A.; ROLLISON, D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. **Molecular Biology Parasitology**. v. 63, p. 153-156, 1994.
- KATO, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**. 2002;30(14):3059–66.

- KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology Evolution**. v. 30, n.4, p. 772-780, 2013. doi: 10.1093/molbev/mst010
- KOLAROVA, L. et al. Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. **Clinical Reviews Allergy Immunology**. v.45, p.63–74. 2013.
- LEE, S.G. et al. A case of endoscopically treated laryngopharyngitis resulting from *Clinostomum complanatum* infection. **Korean Journal of Gastroenterology**. v. 69, n.3, p. 177-180. 2017.
- LI, W.H. Molecular evolution. **Sinauer Associates, Inc.** Sunderland, MA. p.487. 1997.
- LOKER, E.S.; BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M.; KRUSE, K.T. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology**. v.68, p.84-94.1982
- MARINO, J.A.; HOLLAND, M. P.; MIDDLEMIS MAHER, J. Predators and trematode parasites jointly affect larval anuran functional traits and corticosterone levels. **Oikos**. v.123,p. 451–460. 2014.
- MATOS, F.A.; SANT'ANNA, V.; MALDONADO, A.J.; PINHEIRO, J. Morphology of *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda) cercariae. **Brazilian Journal of Biology**. v.21. 2017. doi: 10.1590/1519-6984.169855
- MOSZCZYNSKA, A. et al. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminthes. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, sup. 1, p. 75–82, 2009. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02634.x
- NIEWIAOMSKA, N. Family Strigeidae Railliet, 1919. In: BRAY, R.A.; GIBSON, D.I.; JONES, A. **Keys to the Trematoda**. Vol. I, London: CAB International and The Natural History Museum, 2002. Cap.21, p. 231-244.
- NOLAN, M.J.; CRIBB, T.H. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenetic species. **Advances in Parasitology**. v.60. 2005. doi: 10.1016/S0065-308X(05)60002-4
- PARAENSE, W.L. "*Biomphalaria amazonica*" and "*B. cousini*", two new species of neotropical planorbid molluscs. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 26, n.2, p. 115-26. 1966a.
- PARAENSE, W.L. The synonymy and distribution of "*Biomphalaria peregrina*" in the tropical region. **Revista Brasileira de Biologia**. v.26, n.3, p. 269-96. 1966b.
- PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Do Museu Nacional Do Rio de Janeiro**. v.55, p. 105-28. 1975.
- PARAENSE, W.L. The sites of cross and self-fertilization in planorbid snails. **Revista Brasileira de Biologia**. v.36, p. 535-39. 1976.
- PARAENSE, W.L. *Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca

Basommatophora Pulmonata. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 76, n.2, p. 199-211. 1981.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* ssp. N. from southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 79, n. 4, p. 465-69. 1984.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria kuhniiana* (Clessin, 1883), Planorbid Mollusc from South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 83, n.1, p. 1-12. 1988.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria obstructa* (Morelet, 1849): A study of topotypic specimens (Mollusca: Pulmonata: Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 85, n. 4, p. 391-99. 1990.

PARAENSE, W.L. Neotropical Planorbid snails with apertural lamellae. I *Biomphalaria helophila* (Orbigny, 1835). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 91, p. 177-86. 1996.

PARAENSE, W.L.; DESLANDES, N. A description of *Taphius andecolus*. **Revista Brasileira de Biologia.** v.16, p. 149-58. 1957.

PARAENSE, W.L.; DESLANDES, N. Observations on *Taphius havanensis* (Pulmonata: Planorbidae). **Revista Brasileira de Biologia.** v.18, p. 87-91. 1958a.

PARAENSE, W.L.; DESLANDES, N. Observations on *Taphius pronus* (Martens, 1873) (Pulmonata: Planorbidae). **Revista Brasileira de Biologia.** v.18, p. 367-73. 1958b.

PARK C. W. et al. A human case of *Clinostomum complanatum* infection in Korea. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, p. 401–404, 2009.

PINTO, H. A. **Biologia e Taxonomia de Trematódeos Transmitidos por Moluscos Dulciaquícolas na Represa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.** 2013. 300 f. Tese (Doutorado em Parasitologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PINTO, H. A. et al. *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) as an Intermediate Host of *Ribeiroia* sp. (Trematoda: Psilostomidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, n.5, p. 914–918, 2013.

PINTO, H.A. et al. Experimental and Molecular Study of Cercariae of *Clinostomum* sp. (Trematoda: Clinostomidae) from *Biomphalaria* spp. (Mollusca: Planorbidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 108–113, 2015.

PINTO, H.A. et al. *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) as an intermediate host of *Drepanocephalus* spp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil: a morphological and molecular study. **Parasitology Research**, v. 115, p. 51–62, 2016. doi: 10.1007/s00436-015-4469-0

PINTO, H.A; MATI, V. L. T.; MELO, A.L. Dermatite Cercariana Por Esquistossomatídeos de Aves: É Possível a Ocorrência de Casos no Brasil? **Revista de Patologia Tropical.** v.41, n.1, p. 1-14, 2012.

- PINTO, H.A.; MELO, A.L. Larvas de Trematódeos em Moluscos do Brasil: Panorama e Perspectivas Após um Século de Estudos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 4, p. 369-386, 2013. doi: 10.5216/rpt.v42i4.27922.
- PINTO, H.A.; MELO, A.L. Significance of correct identification of larval trematodes in molluscs. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n.11, p. 924, 2015. doi: 10.1016/S2222-1808(15)60958-6
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology Evolution**. v.25,n.7, p.1253–6. 2008.
- RAMBAUT ,A. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. **Inst Evol Biol Univ Edinburg**. 2009. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- RODRIGUES-LUIZ, G.F. et al. TipMT: Identification of PCR-based taxonspecific markers. **BMC Bioinformatics**, v. 18, p. 104, 2017. doi: 10.1186/s12859-017-1485-3
- RUIZ, J.M. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematódeos brasileiros. 2. Fauna de Santos, est. de S. Paulo. **Memórias do Instituto Butantan**. v. 24, p. 17-36, 1952.
- RUIZ, J.M. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematódeos brasileiros. 5 – descrição de três furcocercárias que ocorrem em planorbídeos hospedeiros do *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Butantan**. v. 25, p. 77-89, 1953.
- SAH, R.; KHADKA, S.; HAMAL, R. POUDYAL, S. Human echinostomiasis: a case report. **BMC Research Notes**. v. 11, n.17. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3133-z>
- SANDLAND G.J.; RODGERS, J.K.; MINCHELLA, D.J. Interspecific antagonism and virulence in hosts exposed to two parasite species. **Journal of Invertebrate Pathology**. 2007; 96:43–7.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SCHELL, S.C.. How to Know the Trematodes. **William C. Brown Company Publishers**. p.355. 1970.
- SCHULER, G. D. Sequence mapping by electronic PCR. **Genome Research**, v. 7, n. 5, p. 541-50, 1997.
- SOUZA, C.P. et al. Lymnc snails from the microregion of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil with na emphasis on parasite disease vectors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 31, n.5, p. 449-456. 1998.
- SOUZA, C.P.; LIMA, LC. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil** (Série de esquistosomose n.º1). 2ed. Belo Horizonte: Fiocruz/CPqRR. 1997
- SPATZ, L. et al. Molecular Study of Similar *Biomphalaria* Species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.93, sup. I, p. 169-170. 1998

SPATZ, L. et al. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. **Journal of Molecular Studies**. v.65, p.143-49. 1999.

SPATZ, L. et al. Characterization of *Biomphalaria orbigny*, *Biomphalaria peregrina* and *Biomphalaria oligoza* by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Digestion of the Internal Transcribed Spacer Region of the RNA Ribosomal Gene. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. .v. 95, n.6, p.807-814. 2000.

STEENKISTE, N.V.; LOCKE, S.A.; CASTELIN. M.; MARCOGLIESE, D.J.; CATHRYN, L. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). **Molecular Ecology Resources**. v.15, n.4, p.945-52. 2015.

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. **Systematic Biology**. v.56, n.4, p.564–77. 2007.

THIELE, E.A.; MINCHELLA, D.J. Molecular assessment of trematode co-infection and intraspecific competition in molluscan intermediate hosts. **Molecular Biochemical Parasitology**. v.187 (1), p. 52-59. 2013. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.12.003.

TIEWCHALOERN, S. et al. *Clinostomum* trematode from human eye. **Southeast Asia Journal of Tropical Medicine Public Health**. v. 30(2), p.382-384. 1999.

TKACH, V.V.; KUDLAI, O.; KOSTADINOVA, A. Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). **International Journal for Parasitology**. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.11.001>

TOLEDO, R.; ESTEBAN, J.G.; FRIED, B. Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. **Advances in Parasitology**. v. 63. 2006. doi: 10.1016/S0065-308X(06)63004-2

TOLEDO, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J.G. Intestinal trematode infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 2014;766:201–40.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

VIDIGAL, T.H.D.A. et al. Genetic Variability and Identification of the Intermediate Snail Hosts of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.93, p. 103-10. 1998a.

VIDIGAL, T.H.D.A. et al. *Biomphalaria spp*: Identification of the Intermediate Snail Hosts of *Schistosoma mansoni* by Polymerase Chain Reaction Amplification and Restriction Enzyme Digestion of the Ribosomal RNA Gene Intergenic Spacer. **Experimental Parasitology**. v. 89, p.180-87. 1998b.

VIDIGAL, T.H.D.A. et al. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.95, n.1, p. 57-66. 2000.

VIDIGAL, T.H.D.A. et al. Identification of *Biomphalaria havanensis* and *Biomphalaria obstructa* Populations from Cuba Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism of the Ribosomal RNA Intergenic Spacer. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, n.5, p. 661-665. 2001.

VILAS, R.; CRISCIONE, C. D.; BLOUIN, M.S. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. **Parasitology**, 2005. doi:10.1017/S0031182005008437

YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134, 2012.

ANEXO 1- Procedimento Operacional Padrão (POP) - Fixação, Registro e Armazenamento de Cercarias no LHMM



TÍTULO TIPO: POP	FIXAÇÃO, REGISTRO E ARMAZENAMENTO DE CERCARIAS NO LHMM	CÓDIGO LHMM -39
-----------------------------------	---	----------------------------------

PALAVRA-CHAVE CERCÁRIAS; INVERTEBRADOS; LARVAS; <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> .	REVISÃO 01
--	----------------------

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Documentos Associados
4. Definições
5. Siglas
6. Condições gerais
7. Procedimento
8. Responsabilidades
9. Referências bibliográficas
10. Anexos

1. OBJETIVO

Este procedimento fixa condições, padroniza, define e estabelece procedimentos para fixação e codificação de cercarias.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este procedimento aplica-se ao Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica, Coleção de Malacologia Médica e Referência Nacional em Esquistossomose (RNE).

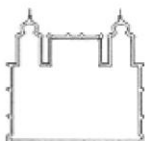
1. DOCUMENTOS ASSOCIADOS

MOL- 08 Exame de Infectividade de *Biomphalaria* Coletados no Campo.

ELABORADO CRISTIANE MENDONÇA	VERIFICADO ROBERTA CALDEIRA	APROVADO OMAR CARVALHO	DATA	PÁGINAS 4
--	---------------------------------------	----------------------------------	-------------	---------------------

BANCO DE DADOS ISODOC

ELABORADOR DA REVISÃO 00 _____
(se aplicável)



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 – FAX: (31) 3295-3115
<http://www.epqrr.fiocruz.br>



TÍTULO	FIXAÇÃO, REGISTRO E ARMAZENAMENTO DE	CÓDIGO
TIPO:	CERCARIAS	LHMM 39

LHMM SR-02 Registro De Recebimento, Fixação, Codificação E Exame Dos Invertebrados.
 GQ-28 Paramentação e Conduta no Laboratório.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica

3. SIGLAS

LHMM	Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica
RNE	Referencia Nacional em Esquistossomose
EPI	Equipamento de Proteção Individual
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
POP	Procedimento Operacional Padrão

4. CONDIÇÕES GERAIS

Os moluscos *Biomphalaria* provenientes do campo, destinados ao LHMM (Pesquisa, Referencia ou Coleção), serão recebidos e examinados para verificar a infecção por cercarias de *Schistosoma mansoni* no Moluscário Lobato Paraense, conforme o POP MOL 08. Segundo este pop, as cercárias encontradas neste exame serão armazenadas em tubos de polietileno e encaminhadas ao LHMM para fixação, registro e armazenamento (etapas realizadas no LHMM- sala gel).

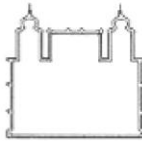
5. PROCEDIMENTO

7.1. Todos os procedimentos de biossegurança devem ser obedecidos de acordo com o GQ-28, tais como utilização de calça comprida, calçados fechados e baixos, jaleco de mangas compridas e luvas.

7.2 Procedimento para fixação à quente das amostras:

7.2.1 Adicionar água aquecida a 70°C nos recipientes onde estão as cercárias vivas.

REVISÃO	PÁGINA
01	2 / 4



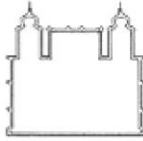
Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 – FAX: (31) 3295-3115
<http://www.epqrr.fiocruz.br>



TÍTULO	FIXAÇÃO, REGISTRO E ARMAZENAMENTO DE	CÓDIGO
TIPO:	CERCARIAS	LHMM 39

<p>7.2.2 Aguardar que a água aquecida atinja temperatura ambiente.</p> <p>7.2.3 Decantar as cercarias mortas. O próprio peso das cercarias faz com que elas decantem para o fundo do recipiente.</p> <p>7.2.4 Retirar o máximo possível de sobrenadante, sempre observando em lupa se não está retirando nenhuma cercaria.</p> <p>7.2.5 Transferir as cercárias para um tubo de polietileno de 1,5mL. Codificar o tubo segundo numeração sequencial do laboratório, registrando o código no Anexo A do POP LHMM SR-02.</p> <p>7.2.6 Acrescentar álcool 95% até completar o volume total.</p> <p>7.2.7 Centrifugar em baixa rotação, por 30 segundos.</p> <p>7.2.8 Repetir passo 4.</p> <p>7.2.9 Acrescentar álcool 95% até completar o volume do tubo.</p> <p>7.3 O tubo contendo as cercarias ficará armazenado em temperatura ambiente na sala da Coleção de Malacologia Médica, em gaveta específica.</p> <p>7.4 A localização dos tubos será inserida no arquivo eletrônico intitulado "Livro de Tombo CMM e HMM".</p> <p>8 RESPONSABILIDADES</p> <p>A execução deste procedimento é de responsabilidade de todos os Profissionais devidamente treinados.</p> <p>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</p> <p>PINTO, H. A. <i>Biologia e Taxonomia de Trematódeos Transmitidos por Moluscos Dulciaquícolas na Represa da Pampulha</i>, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 2013. 300 f. Tese (Doutorado em Parasitologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.</p>

REVISÃO	PÁGINA
01	3 / 4



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 – FAX: (31) 3295-3115
<http://www.epqrr.fiocruz.br>



TÍTULO TIPO:	FIXAÇÃO, REGISTRO E ARMAZENAMENTO DE CERCARIAS	CÓDIGO LHMM 39
-------------------------------	---	---------------------------------

SOUZA C. P. & LIMA L. C. 1990. *Moluscos de interesse parasitológico do Brasil*, Belo Horizonte, Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, 76p. Série Esquistossomose 1.

Vigilância e controle de Moluscos de importância epidemiológica: Diretrizes Técnicas: Programa de Vigilância e controle da Esquistossomose (PCE)/Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. PP. 54-58.

10 ANEXOS

Não se aplica.

REVISÃO	PÁGINA
01	4 / 4

ANEXO 2- Comprovante do Depósito da Patente “Kit e Método para Diagnóstico Molecular Diferencial de Trematódeos”.



22/02/2018 870180014216
10:33



3158861707217459

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 003431 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

Pais: Brasil

Telefone: (31) 340946430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2018 às 10:33, Petição 870180014216

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): "KIT E MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DIFERENCIAL DE TREMATÓDEOS"

Resumo: A presente tecnologia trata de um kit contendo um painel de primers família-específicos para diagnóstico diferencial de quatro famílias (Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistomatidae e Strigeidae) de helmintos pertencentes à Classe Trematoda. Os primers contidos no kit são direcionados para a região do DNA ribossomal e são capazes de realizar um diagnóstico diferencial entre essas famílias através da PCR multiplex. A tecnologia se refere também a um método utilizando-se do kit para diagnóstico diferencial das referidas famílias de parasitas. Tanto o kit quanto o método podem ser utilizados para diagnóstico de e infecção por estes helmintos em amostras de molusco parasitado.

Figura a publicar: 18