



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**



**INFECÇÃO EXPERIMENTAL E IDENTIFICAÇÃO DE UMA
NOVA ESPÉCIE DE *SPIROMETRA*, NA REGIÃO DO
PANTANAL, BRASIL.**

ANA PAULA ANTUNES NOGUEIRA

Campo Grande – MS

ANA PAULA ANTUNES NOGUEIRA

**EXPERIMENTAL INFECTION AND IDENTIFICATION OF A
NEW SPECIES OF *SPIROMETRA* IN THE PANTANAL,
BRAZIL.**

ANA PAULA ANTUNES NOGUEIRA

Orientador: Fernando Paiva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor(a) em Ciências Veterinárias.

**Campo Grande – MS
2024**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Agentes parasitários com potencial zoonóticos no paraíso ecológico: *Alaria* & *Spirometra*”, registrada com o nº 1.152/2020, sob a responsabilidade de FERNANDO PAIVA - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 1ª reunião ordinária do dia 23/02/2021.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/03/2021 a 05/06/2024
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Canis lupus familiaris</i> /Cão doméstico, <i>Felis catus</i> /Gato doméstico
Nº de animais	8 cães / 8 gatos
Peso/Idade	+/- 1 ano/10 a 13 kg/cães, +/- 1 ano/3 a 5 kg/gatos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Campo Grande

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 23 de fevereiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria, Presidente de Comissão**, em 08/03/2021, às 15:56, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

file:///C:/Users/Deiwes/Downloads/Certificado_2421738.html
Certificado

1/2 28/10/2024, 07:25

SEI/UFMS - 2421738 -

A autenticidade deste documento



pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2421738** e o código CRC **C8826CA9**.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva,
s/nº - Cidade

Universitária Fone:
CEP 79070-900 -
Campo Grande -
MS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



v

ATA DE DEFESA DE TESE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DOUTORADO

Aos vinte e seis dias do mês de novembro do ano de dois mil e vinte e quatro, às dez horas, via *on line*, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Fernando Paiva (UFMS), Carina Elisei de Oliveira (UCDB), Felipe Bisaggio Pereira (UFMG), Luiz Eduardo Roland Tavares (UFMS) e Marcello Otake Sato (Niigata University of Pharmacy and Medical and Life Sciences), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **ANA PAULA ANTUNES NOGUEIRA**, CPF *****.736.251-****, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "Infecção experimental e identificação de uma nova espécie de *Spirometra*, na região do Pantanal, Brasil" e orientação de Fernando Paiva. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

AVALIAÇÃO

Dr. Fernando Paiva (Presidente) _____ (APROVADO)

Dra. Carina Elisei de Oliveira (Externo) _____ (APROVADO)

Dr. Felipe Bisaggio Pereira (Externo) _____ (APROVADO)

Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares (Interno) _____ (APROVADO)

Dr. Marcello Otake Sato (Externo) _____ (APROVADO)

RESULTADO FINAL:

(X) Aprovação () Aprovação com revisão () Reprovação

Assinatura

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Paiva, Professor do Magisterio Superior**, em 27/11/2024, às 14:26, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Marcello Otake Sato, Usuário Externo**, em 28/11/2024, às 21:16, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Eduardo Roland Tavares, Professor do Magisterio Superior**, em 29/11/2024, às 17:55, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Carina Elisei de Oliveira, Usuário Externo**, em 30/11/2024, às 20:28, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Bisaggio Pereirara, Usuário Externo**, em 02/12/2024, às 08:43, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Antunes Nogueira, Usuário Externo**, em 07/12/2024, às 07:19, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5265580** e o código CRC **442607F8**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

*Dedico este trabalho, primeiramente a Deus, que sempre esteve presente me
guiando e protegendo;
A meus pais, Albio e Marta, meus pilares de toda a minha formação;
Ao meu marido, Deiwes, meu apoiador e incentivador;
Ao meu orientador Dr. Fernando Paiva, por toda atenção, dedicação e
inspiração.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Vanda Lúcia Ferreira, pelo apoio inestimável.

Ao Dr. Marcello Otake Sato, por todo apoio.

Aos professores da banca de qualificação Dr. Fernando Borges, Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares e Dr. Felipe Bisaggio, que contribuíram com conselhos essenciais para a finalização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório da UFMS, sempre solícitos.

Aos servidores do canil da CCZ - Campo Grande, em especial ao Lucas Billerbeck, que auxiliaram com o manejo dos animais experimentais;

Às colegas Médicas Veterinárias da CCZ - Campo Grande, Dra. Cláudia Granja Macedo Mota Ferreira, Dra. Juliana Resende Araújo e Dra. Maria Aparecida Conche Cunha pelo apoio institucional.

Às colegas administrativas da CCZ – Campo Grande, Patrícia Campos Fiorini e Eliane Camargo, por todo o apoio burocrático necessário.

Aos servidores da Empresa Producerserv, Rejane da Silva Falcão, “Seu” Rubens e “Seu” Nivaldo, auxiliaram com a manutenção do ambiente experimental.

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1.	Espécies válidas do gênero <i>Spirometra</i>	44
Quadro 2.	Identificação dos animais utilizados na reprodução experimental da infecção com plerocercoides de <i>Spirometra</i> sp.....	55
Quadro 3.	Quantidade de plerocercoides inoculados em cada animal experimental e respectivas espécies do hospedeiros nos quais foram recuperados.....	57
Figura 1.	Representação gráfica ilustrando a posição dos primers usados para amplificação e sequenciamento total do gene citocromo oxidase (Cox1) delineados para o gênero <i>Spirometra</i> ; os quais permitem a amplificação de cerca de 2884 bp.....	60
Quadro 4.	Espécie, e número de plerocercoides recuperados em serpentes, anfíbios e répteis capturados na região da Nhecolândia, Pantanal, MS, Brasil no período de 2018-2021.....	63
Figura 2.	Espécimes de <i>Spirometra</i> sp. sob forma de esparganos em cavidade abdominal do hospedeiro paratênico <i>Leptodeira pulchriceps</i> (Serpente olho de gato) (A e B) e removido em solução salina em placa (C).....	64
Quadro 5.	Tamanho dos ovos, em micras, observados em fezes de cães e gatos infectados experimentalmente com plerocercoides de <i>Spirometra</i>	65
Figura 3.	Espécimes adultos de <i>Spirometra</i> sp. no intestino delgado de cão portador de infecção induzida com esparganos (A e B), e em C detalhe do espécime fixado pelo escólice.....	66
Quadro 6.	Resultados das inoculações experimentais em cães e gatos domésticos com plerocercóides de <i>Spirometra</i> sp. recuperados em répteis, capturados na região da Nhecolândia, Pantanal, MS.....	67
Figura 4.	Porção do estróbilo de <i>Spirometra</i> sp. em corte histológico transversal (A) corado pela hematoxilina-eosina; B- escólice de espécime adulto corado pelo carmim-clorídrico e, C, detalhe do ovo de <i>Spirometra</i> observado nas fezes de cão portador da infecção induzida por esparganos. (Barra de escala = 500 µm).	68
Figura 5.	Imagens de proglotes de <i>Spirometra</i> sp. obtidas em infecção induzida	68

em cão doméstico por esparganos. A- Cortes histológicos transversais sequenciais na mesma proglote madura, proximais, mediais e distais, respectivamente, e corados pela hematoxilina-eosina; B- corte histológico longitudinal em proglotes maduras corado pela hematoxilina-eosina, e C- imagem de proglotes maduras em microscopia eletrônica de varredura. (Barra de escala =500 μ m).

Figura 6. Árvore de consenso inferida por Máxima Verossimilhança (ML) pelo método Hasegawa-Kishino-Yano com alta semelhança logarítmica (-5479,30). As porcentagens nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada acima dos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias em pares estimadas usando a abordagem *Maximum Composite Likelihood* (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de log likelihood superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,2399)). Esta análise envolveu 33 sequências de nucleotídeos, com um total de 1568 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no software MEGA 11. As espécies do grupo África/América estão destacadas em azul e aquelas que se agrupam na Ásia/África/América em verde..... 70

Figura 7. Árvore original inferida por Máxima Verossimilhança (ML) pelo método Hasegawa-Kishino-Yano com alta semelhança logarítmica (-5479,30). As porcentagens nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada acima dos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias em pares estimadas usando a abordagem *Maximum Composite Likelihood* (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de log likelihood superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,2399)). Esta análise envolveu 33 sequências de nucleotídeos, com um total de 1568 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram 71

conduzidas no software MEGA 11. As espécies do grupo África/América estão destacadas em azul e aquelas que se agrupam na Ásia/África/América em verde.....
.....

- Figura 8. Árvore original, contendo *Fasciola* spp. como grupo externo, inferida usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Hasegawa-Kishino-Yano, com a maior verossimilhança logarítmica (-6735,50) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada abaixo dos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de verossimilhança logarítmica superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,7535)). Esta análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos, com um total de 1569 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no software MEGA 11.

72

- Figura 9. Árvore construída no software ASAP - Assemble Species by Automatic Partitioning (<https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/asap.zip>) para o qual foi utilizado o arquivo fasta do alinhamento ClustalW de 33 sequencias, com cerca de 1569 nucleotídeos. Sendo o escore Asap: 3.500000, com probabilidade igual a 5.349301e-01 e identificados 5 sub grupos principais, sendo um grupo desordenado.....

74

- Figura 10. Árvore construída no software GMYC - Generalized Mixed Yule Coalescent (<https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/pyr8s.zip.zip>) para o qual foi utilizado o arquivo fasta do alinhamento ClustalW com 33 sequencias, com cerca de 1569 nucleotídeos.cada. Cinco subgrupos foram identificados: 1- *Spirometra* Pantanal br; 2- *Spirometra folium* (Sin. *S. theileri*); 3- *Spirometra asiana*; outros dois subgrupos (4 e 5) com as demais espécies analisadas,

distribuídas de forma mesclada entre os conjuntos..... 75

- Figura 11. Árvores construídas no software PTP - Poisson Tree Processes, para delimitação de espécies, disponível em <https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/ptp.zip>, para as quais foi empregado o arquivo tipo Newick, gerado após a construção da árvore em ML no software MEGA 11, com as 33 sequências 33, com cerca de 1569 nucleotídeos cada. Em ambas as análises PTP e bPTP, cinco subgrupos foram identificados: 1- *Spirometra Pantanal br*; 2- *Spirometra folium* (Sin. *S. theileri*); 3- *Spirometra asiana*; outros dois subgrupos (4 e 5) com as demais espécies analisadas, distribuídas de forma mesclada entre os conjuntos..... 76

LISTA DE ANEXOS

Quadro 1.	Compilado de relatos de ocorrência de esparganos, hospedeiros, local de ocorrência e prevalência (quando descrita).....	92
Quadro 2.	Compilado de relatos de ocorrência de formas adultas de <i>Spirometra</i> sp., hospedeiros, local de ocorrência e prevalência (quando descrita)...	94
Quadro 3.	Caracteres taxonômicos comparativos entre as espécies de <i>Spirometra</i> sp. disponíveis na literatura.....	95
Quadro 4.	Quadro de análise de estimativa das distâncias evolutivas entre as 33 sequencias analisadas.....	102

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3. OBJETIVOS.....	53
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO	77
7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS.....	92

RESUMO

NOGUEIRA A.P.A. IDENTIFICAÇÃO DE UMA ESPÉCIE DE *SPIROMETRA* NO PANTANAL: UMA ZOONOSE EMERGENTE. 2024. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

Interações entre humanos, animais e meio ambiente contribuem para a dispersão de patógenos, os quais podem infectar humanos e os animais, e dessa forma, ao desenvolvimento de zoonoses, podendo transformar-se em surtos e epidemias, gerando transtornos à saúde pública e determinando grandes perdas econômicas. Com a globalização e consequente introdução de novos hábitos alimentares, como consumo de carnes exóticas e suas formas de preparo, muitas vezes cruas, torna-se previsível a ocorrência de contaminação de humanos, em futuro próximo, com agentes desconhecidos ou mesmo ainda não registrados. Formas imaturas sugestivas de *Spirometra* sp. foram encontradas em répteis e anfíbios na região da Nhecolândia, no Pantanal Sul Matogrossense, e careciam de melhor identificação e caracterização morfológica e molecular. Devido o seu potencial zoonótico, foi imperativo determinar com precisão esse agente etiológico, os fatores biológicos e epidemiológicos envolvidos. Esse parasito tem como hospedeiro definitivo, canídeos e felídeos, e para completar o ciclo, necessita de dois hospedeiros intermediários, sendo os primeiros copépodes, onde se desenvolve o procercoide, e os segundos, anfíbios, répteis e pequenos mamíferos que ingerem os copépodes infectados e desenvolve-se o plerocercóide ou espargano. A predação desses segundos hospedeiros por canídeos ou felídeos, determina a compleição do ciclo pelo estabelecimento da forma adulta de *Spirometra* no intestino delgado. Porém a ingestão do hospedeiro intermediário, portadores de esparganos, por outros vertebrados, que não os seus hospedeiros definitivos, na maioria das vezes, se tornam hospedeiros paratênicos. Em relação, aos humanos, a esparganose se instala ao ingerir o segundo hospedeiro infectado, água com copépodes contaminados, ou uso de cataplasmas de tecidos com formas de esparganos, assim se tornando um hospedeiro acidental. O parasita apresenta distribuição mundial, porém com maior ocorrência nos países asiáticos, onde é responsável por sérios danos à saúde pública. Em determinadas regiões, a prevalência em hospedeiros definitivos pode chegar a 90%. Neste trabalho foi identificada e caracterizada a espécie de *Spirometra* encontrada na forma de plerocercóide, em anfíbios, serpentes e répteis capturados no Pantanal da Nhecolândia. Formas de esparganos recuperadas em anfíbios e répteis, capturados no Pantanal, foram inoculados por via oral em quatro cães e três gatos, na tentativa de instalar uma infecção experimental e recuperação da forma adulta do parasita, que é a única forma de caracterizar a espécie morfológicamente. Após o período prepatente, 13 dias, formas adultas de *Spirometra* spp. foram recuperadas nos animais experimentais, e posteriormente caracterizadas morfológicamente em microscopias de luz e eletrônica de varredura, também molecularmente, pelo sequenciamento completo do gene *cox1*. Também foram realizadas análises filogenéticas e delimitação de espécies através dos métodos ABGD, ASAP, GMYC, PTP e bPTP. Foi constatada a ocorrência de uma nova espécie de *Spirometra* em animais no Pantanal. Os caracteres taxonômicos empregados para a descrição do gênero são fracos e relativamente subjetivos, porém a análise molecular e os métodos delimitadores de espécie empregados foram unânimes ao classificar o isolado como uma nova espécie de *Spirometra*.

Palavras-chave: *Spirometra*, zoonoses, esparganose, taxonomia integrativa.

ABSTRACT

NOGUEIRA A.P.A. IDENTIFICATION OF A SPECIES OF *SPIROMETRA* IN THE PANTANAL: AN EMERGING ZONOSIS. 2024. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

Interactions among humans, animals, and environment contribute to the dispersion of pathogens that can infect both humans and animals, leading to the development of zoonoses. This can result in outbreaks and epidemics, causing disturbances to public health and significant economic losses. With globalization and the consequent introduction of new dietary habits, such as the consumption of exotic meats and their often-raw preparation methods, it becomes predictable that contamination of humans by unknown or even unrecorded agents will occur in the near future. Immature forms suggestive of *Spirometra* sp. were found in reptiles, amphibians, and snakes in the Nhecolândia region of the Pantanal in Southern Mato Grosso, and they required better identification and morphological and molecular characterization. Due to their zoonotic potential, it was imperative to precisely determine this etiological agent and the biological and epidemiological factors involved. This parasite has canids and felids as its definitive hosts and requires two intermediate hosts to complete its life cycle: the first are copepods, where the proceroid develops, and the second are amphibians, reptiles, lizards, and small mammals that ingest the contaminated copepods, in which the plerocercoid or sparganum develops. The predation of these second intermediate hosts by canids or felids completes the cycle by establishing the adult form of *Spirometra* in the small intestine. However, the ingestion of the intermediate host, which carries sparganum, by other vertebrates that are not its definitive hosts often leads to them becoming paratenic hosts. In humans, sparganosis occurs when ingesting the contaminated second host, contaminated water containing copepods, or using poultices made from tissues with sparganoid forms, thus becoming an accidental host. This zoonotic parasite has a worldwide distribution, with a higher concentration in Asian countries, where it is responsible for serious public health issues. In certain regions, the prevalence in definitive hosts can reach up to 90%. In this study, the species of *Spirometra* sp. found in the plerocercoid form in amphibians, snakes, and reptiles captured in the Pantanal of Nhecolândia was identified and characterized. Forms of sparganoids recovered from snakes, amphibians, and reptiles captured in the Pantanal were inoculated into four dogs and three cats in an attempt to establish an experimental infection and recover the adult form of the parasite, which is the only form capable of morphologically characterizing the species. After the prepatent period of 13 days, adult forms of *Spirometra* spp. were recovered from the experimental animals and subsequently characterized morphologically using light and scanning electron microscopy, as well as molecularly by complete sequencing of the *cox1* gene and phylogenetic analyses and using the species delimitation methods ABGD, ASAP, GMYC, PTP, and bPTP. The occurrence of a new species of *Spirometra* sp. in animals from the Pantanal was confirmed. The taxonomic characters used for this genus description are weak and relatively subjective; however, the molecular analysis and the species delimitation methods employed unanimously classified the isolate as a new species of *Spirometra*.

Keywords: *Spirometra*, zoonosis, sparganosis, integrative taxonomy.

1. INTRODUÇÃO

Interações entre humanos, animais e meio ambiente ocorrem de maneira diversa e complexa. Podem contribuir para dispersão de vários patógenos que podem infectar o homem e os animais, e dessa forma, contribuir para o desenvolvimento de zoonoses e outras doenças que podem constituir novos surtos e epidemias, gerando transtornos à saúde pública e determinando grandes perdas econômicas.

Dentre os patógenos transmitidos por alimentos, e potencialmente zoonóticos, aqueles de origem animal, destacam-se como os maiores responsáveis por surtos (BRASIL, 2010), sendo importante causa de morbidade e mortalidade, e caracterizados como um problema emergente em saúde pública. Estima-se que devido às transformações globais, crescimento da população, pobreza, exportação de alimentos e rações animais, esse problema aumente ainda mais nos próximos anos (BRASIL, 2019).

A zoonose parasitária transmitida por alimentos de origem animal mais frequente é a cisticercose (ALMEIDA et al., 2006), responsável pela Teníase humana, sendo o homem o único hospedeiro definitivo. A infecção ocorre pela ingestão de cisticercos de *Taenia saginata* ou *T. solium*. O homem pode atuar como hospedeiro intermediário, quando ingere ovos de *T. solium*, desenvolvendo a cisticercose (SANTOS E BARROS, 2009).

Outra parasitose com impacto em saúde pública é a Anisakiase, transmitida através da ingestão de frutos do mar crus ou malcozidos, é uma importante e emergente zoonose devido ao aumento do consumo de “sushi” e “sashimi” (BROGLIA E KAPEL, 2011). Seus principais agentes etiológicos são larvas dos nematodas *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* e *Contracaecum osculatum*. Ao infectarem humanos, causam sintomas de formigamento na garganta, dor abdominal, náuseas e anafilaxia (PRATA, 1999).

A Triquinelose, causada por *Trichinella* spp., é uma zoonose de grande relevância para a saúde pública e quando acomete o homem, através da ingestão de carne infectada crua ou malcozida, causa desde quadros digestivos, até nefrite, pneumonia, meningite, encefalite e miocardite, devido à migração sistêmica das larvas (PEGORINI et al., 2005). Embora não ocorra no Brasil, é

124 endêmica na Argentina (RIBICICH et al, 2005), e alvo de inspeção constante na
125 carne suína brasileira, devido à barreiras sanitárias e comerciais (BRASIL, 2002).

126 Além de causar sérios danos à saúde, essas parasitoses são responsáveis
127 por importantes prejuízos econômicos, a exemplo da cisticercose que é
128 responsável pela principal causa de condenação de carcaças bovinas abatidas no
129 Brasil (ALMEIDA et al., 2006).

130 Da classe cestoda, outro causador de zoonose é *Dibothriocephalus latus*,
131 tendo o salmão como principal e mais frequente hospedeiro paratênico, pode
132 levar humanos a quadros de anemia megaloblástica, distensão abdominal,
133 flatulência, cólicas e diarreia, cuja infecção ocorre pelo consumo de peixes crus
134 ou malcozidos, contendo o plerocercóide em sua musculatura. O homem,
135 canídeos, felídeos e ursos atuam como hospedeiros definitivos (PRATA, 1999).

136 A classe cestoda representa um grupo peculiar devido sua habilidade de
137 parasitar a maioria dos grupos de tetrápodes, incluindo o homem. Depois de um
138 longo período de negligência, esse grupo que era de ocorrência
139 predominantemente em animais selvagens começou a chamar a atenção da
140 comunidade científica e de saúde devido ao número crescente de casos humanos
141 relatados, principalmente após a popularização de consumo de carnes cruas em
142 países desenvolvidos (SCHOLZ et al., 2019).

143 Dentre esses, têm se destacado como zoonose parasitária transmitida por
144 alimentos, particularmente o gênero *Spirometra*, caracterizando-se por ocorrer em
145 regiões alagadas ao redor do mundo. Os parasitos desse gênero apresentam
146 ciclo que envolve principalmente a ingestão de carne crua ou malcozida dos
147 hospedeiros intermediários ou paratênicos e dessa maneira representa potencial
148 zoonótico, apresentando relatos de graves patologias em seres humanos
149 (SHIRAKAWA et al., 2010).

150 Formas parasitárias com características morfológicas de plerocercóides de
151 *Spirometra* spp. foram observados em serpentes, répteis e anfíbios na região do
152 Pantanal (dados não publicados), porém careciam de melhor identificação e
153 caracterização morfológica e molecular, de tal forma a gerar conhecimentos sobre
154 tais organismos parasitos, nas condições da região, para uma eventual
155 necessidade de intervenções no caso de seus registros em humanos. Portanto é
156 necessário conhecer não apenas o agente etiológico, mas fatores biológicos e

ambientais que interagem na epidemiologia desses agentes, por ora desconhecidos do sistema de saúde em nosso país.

Considerando a grande diversidade de hospedeiros examinados nas condições do Pantanal, que albergam formas imaturas infectantes desse gênero reconhecido como zoonótico, assim como a recente introdução da prática de caça ao javali e as “aventuras gastronômicas” se disseminando na população, como o consumo de carnes exóticas e suas formas de preparação, por exemplo o consumo de carnes de peixes e de jacarés cruas preparadas rusticamente nos barcos de pesca em condições de higiene inadequadas torna previsível a ocorrência de infecção de humanos, em futuro próximo, com agentes desconhecidos ou mesmo ainda não registrados, justificando a necessidade do estudo dessa parasitose na região pantaneira.

O presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar a(s) espécie(s) de *Spirometra* spp. encontradas na forma de plerocercóide, em anfíbios e répteis capturados no Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Para atingir os objetivos, foram empregadas técnicas de taxonomia integrativa, agregando aspectos morfológicos, e moleculares, pela indução de infecção experimental em cães e gatos domésticos, como estratégia para identificação segura dos espécimes adultos.

2. REVISÃO

A classificação taxonômica no gênero *Spirometra* tem sido controversa e sujeita a mudanças de nomenclatura, bem como a questionamentos quanto a validação de algumas espécies. Alguns autores apontam que espécies idênticas estão descritas com nomenclatura diferentes, além de destacar a alta variabilidade intraespecífica e a fragilidade, ou mesmo ausência de caracteres taxonômicos diagnósticos (KUCHTA et al., 2015 e 2021; JEON et al., 2016a). Originalmente, foi classificada como um subgênero de *Diphyllbothrium*, sendo posteriormente reclassificado como um gênero independente (ZHANG et al., 2015b).

A identificação taxonômica das espécies baseada em frágeis caracteres morfológicos, implica em sérias imprecisões diagnósticas. Devido a essas

divergências, ferramentas moleculares têm sido amplamente utilizadas para elucidar a validação das espécies de *Spirometra* (BADRI et al., 2017), portanto, torna-se urgente uma revisão das espécies descritas para uma adequada organização da classificação deste gênero.

O parasito apresenta um ciclo biológico complexo envolvendo três hospedeiros: pelo menos dois intermediários e um definitivo. A forma adulta é encontrada no intestino delgado de canídeos e felídeos, que liberam ovos não embrionados nas fezes. Em contato com o ambiente, os ovos se tornam embrionados e, ao alcançarem a água, ocorre a eclosão, liberando o coracídio, que são ingeridos por copépodes, seus primeiros hospedeiros intermediários. Na cavidade do corpo desses hospedeiros, o coracídio se desenvolve na larva procercoide. Ao ingerirem copépodes infectados, anfíbios, répteis, pássaros ou mamíferos tornam-se segundos hospedeiros intermediários ou paratênicos. A larva penetra na parede intestinal em direção à musculatura ou órgãos internos, desenvolvendo-se na larva plerocercóide ou espargano. Canídeos e felídeos ingerem o segundo hospedeiro intermediário infectado e assim, desenvolve-se o adulto em seus intestinos (REGO e SCHÄFFER, 1992; SILES-LUCAS e HEMPHILL, 2002; COSTA et al., 2019; KUČHTA et al. 2021). Adicionalmente, os hospedeiros intermediários secundários podem ser ingeridos por outros hospedeiros paratênicos, como primatas não humanos, suídeos, aves, e roedores.

O homem se torna um hospedeiro errático, quando ingere hospedeiros intermediários ou paratênicos (LESCANO e ZUNT, 2013), ou tecidos destes na forma de carne crua ou malcozida e também pela utilização de cataplasmas desses hospedeiros. A esparganose também pode ser contraída pela ingestão de água contaminada com copépodes infectados. O plerocercóide se desenvolve em tecido subcutâneo, adiposo, muscular, e órgãos como cérebro, espinha, bexiga, rins, pulmões, olhos, fígado, coração ou cavidade abdominal dos hospedeiros paratênicos (KUČHTA et al., 2015; KUČHTA et al., 2021).

Cada fase do ciclo apresenta características epidemiológicas, morfológicas, biológicas, e patológicas distintas, que estão descritas a seguir:

2.1 Ovos

Caracterizam-se por serem operculados, de coloração variando entre castanho escuro, marrom claro ou amarelado, elípticos, com polos assimétricos (um afilado e um arredondado, ou em formato de cone), e pleomorfismo generalizado, mesmo observados através da mesma técnica de preparação (SCIOSCIA et al., 2014; URIBE et al., 2021; FERRAZ et al., 2020; SAHOO et al., 2018).

O tamanho dos ovos foi similar em diversos trabalhos, trazendo exemplos como: 60 x 44µm (FERRAZ et al., 2020); 60,72 x 33,38µm (URIBE et al., 2021); 66,64 x 37,11µm (SCIOSCIA et al., 2014); 60 x 40µm (UGARTE et al., 2005, 83); 61-65 x 31-33µm (NATH et al., 2021); 66 x 40µm (WANG et al., 2012); 55-66 x 27-41µm e 53,4 x 30,3µm (SIANTO et al., 2014); 51-58 x 31-36µm (GRESSLER et al., 2016); 58,8 x 33,6µm (VIZCAYCHAPI et al., 2016).

Por microscopia eletrônica, o ovo é descrito com formato elíptico, extremidades levemente pontiagudas, laterais ligeiramente curvadas e com muitos poros na superfície (CHEN et al., 2022).

Em uma reprodução experimental com cães, os ovos foram encontrados a partir dos 19 dias e durante nove meses de avaliação. A produção diária de ovos nas fezes apresentou flutuação cíclica, com picos a cada 3 a 4 semanas intercaladas com períodos de vários dias sem liberação de ovos, o que provavelmente ocorre devido ao fato de uma quantidade de proglótides que estavam produzindo grande quantidade de ovos se libertarem e em seguida, eliminadas pelo intestino (OPUNI & MULLER, 1974).

2.2 Coracídio e Procercoide

Existem poucos estudos acerca da infecção por *Spirometra* nessas fases larvais. O coracídio tem formato oval, medindo entre 80-90µm de diâmetro com a membrana embrionária ciliada (LIU et al., 2015b), e quando ingeridos e transformados em procercoides, levam entre 3 a 21 dias para se desenvolverem no hospedeiro, a depender da temperatura da água (CHERVY, 2002).

Copépodes do gênero *Cyclops*, *Diacyclops*, *Ectocyclops*, *Leptocyclops*, *Macrocyclops*, *Megacyclops*, *Mesocyclops*, *Microcyclops*, *Paracyclops* e

Thermocyclops, foram confirmados como primeiros hospedeiros intermediários de *Spirometra*, por infecções naturais ou experimentais (KUCHTA et al., 2024).

Na China foi relatada uma prevalência de 3,5% de procercoides no copépode *Mesocyclops leuckarti*, com intensidade de 3 a 5 procercoides por copépode (LIN et al., 2010). Em uma região na Ucrânia, copépodes de dois açudes habitados por Martas (*Martes martes*) infectadas por plerocercoides foram estudados para pesquisa de procercoides. A infecção foi constatada, embora fossem necessários exames moleculares para confirmação da espécie (RUBTSOVA e HECKMANN, 2020), uma vez que a identificação em nível de espécie utilizando ferramentas morfológicas é impossível nesses estágios do parasito (SCHOLZ et al., 2019).

2.3 Plerocercóide ou Espargano

2.3.1 Características do plerocercóide

O metacestoda de *Spirometra* é caracterizado por ser uma larva plerocercóide, pois apresenta desenvolvimento parcial de escólex e estruturas que se desenvolverão em bótrias (CHERVY, 2002). Nessa fase, é o causador da esparganose, doença em que o plerocercóide se aloja em tecidos no homem (KUCHTA et al., 2015) e são denominados esparganos (SCHOLZ et al., 2019).

Os plerocercóides podem permanecer viáveis por mais de 12 horas (RUBTSOVA e HECKMANN, 2020). O corpo dessa larva apresenta coloração amarelada e pós fixação em etanol torna-se esbranquiçado e opaco, com aparência sólida e pseudosegmentada (CHI et al., 1980; KAVITHA et al., 2013; RUBTSOVA e HECKMANN, 2020). Macroscopicamente, tem aspecto leitoso, enrugado e achatado, encurtando de 3 a 8 vezes e aumentando consideravelmente sua largura quando em solução salina (NELLI et al., 2014). Estudos na China, observaram esparganos medindo de 1 a 13cm de comprimento por 0,5 a 2,5mm de largura (ZHANG et al., 2014; ZHANG et al., 2015b) e no Sri Lanka, medindo entre 1 e 10cm (SILVA et al., 2022) com a parte anterior mais larga e apresentando dois sulcos longitudinais, as bótrias. Microscopicamente, apresentavam cutícula. O tecido subcuticular e parenquimatoso é preenchido por

feixes musculares dispostos aleatoriamente ou formando uma rede (KAVITHA et al., 2013).

No escólice, situa-se a fissura botrial, que mede aproximadamente 0,2mm de largura por 0,4mm de comprimento. O tegumento é bem desenvolvido tendo espessura de 0,007 a 0,008mm, sem vilosidades (NELLI et al., 2014).

Em um estudo histopatológico da esparganose, CHI et al. (1980) relataram que o tamanho do plerocercóide varia muito em cada caso. Em seu estudo, foram observados espécimes com 2,5cm x 0,2cm, até 45cm x 0,8cm, sugerindo que o tamanho pode ser influenciado pelo tipo do tecido em que se aloja. Esses autores descreveram o parasito como plano, espesso, com tegumento eosinofílico levemente ondulado sobrepondo uma camada de células subparenquimatosas orientadas radialmente, com uma camada muscular longitudinal. Canais excretores foram identificados nas regiões laterais do parênquima. Existiam corpos calcários no parênquima entremeados aos feixes musculares dispostos perpendicularmente à superfície do parasito. Secções longitudinais mostraram uma invaginação superficial do tegumento, bem como os canais excretores e os cordões nervosos (CHI et al., 1980).

Em microscopia eletrônica de varedura, foi observado que o escólice do plerocercóide é plano, não segmentado, com a região anterior larga, estrias horizontais e uma aparente depressão nessa extremidade (CHEN et al., 2022).

HATSUSHIKA e OKINO (1987) descreveram detalhes do protoescólice do plerocercóide através de análises morfológicas em microscopia de luz, corados pela Hematoxilina de Delafield e por microscopia eletrônica de varredura. Os autores relataram os movimentos de expansão e contração do escólice, destacando o formato elíptico (“formato de colher”) como pequenas porções protuberantes na superfície ventral e dorsal, que se estendem em torno de 0,3mm a partir da porção apical, e consideraram como bótria em desenvolvimento incompleto. A fossa frontal claramente reconhecida na região superior apical, apresentava uma abertura em torno de 8µm de diâmetro. Toda a superfície do escólice é densamente coberta por microtríquias.

MORALES et al. (2022) descreveram plerocercóides alongados, cônicos e pseudo-segmentados, com medidas aproximadas de 0,5mm de largura x 40mm de comprimento, com grande mobilidade nos movimentos de expansão e contração, além de discreta invaginação no escólice primitivo. Em coloração de

hematoxilina e eosina apresentou camada tegumentar com microvilosidades, camada de células musculares e camada de tegumento. No parênquima, feixes musculares longitudinais, fibras mesenquimatosas, canais excretorios e corpúsculos calcáreos, além de ausência de órgãos reprodutores.

A maioria das amostras clínicas de esparganos não foram caracterizadas molecularmente e nem possuem material depositado para novas análises (SCHOLZ et al., 2019). Esses autores também mencionaram que a pobre descrição taxonômica e classificação de muitos casos podem ter ocorrido erroneamente, a exemplo de relatos de ocorrência de *Spirometra erinaceieuropaei* na Europa, baseado apenas na descrição morfológica de um plerocercóide.

2.3.2 Epidemiologia

A *Spirometra* sp. é considerada eurixena, o que significa que sua baixa especificidade de hospedeiros contribui para a dispersão e manutenção do parasito em determinadas localidades, além de ocasionar eventuais infecções humanas (KUCHTA et al., 2015).

Humanos não são hospedeiros definitivos e não desenvolvem a fase adulta do parasito e desta forma caracterizam-se como hospedeiros intermediários erráticos (KUCHTA et al., 2015).

Os fatores de risco para a ocorrência da esparganose humana envolvem a ingestão de carne crua ou malcozida de hospedeiros intermediários como anfíbios, répteis, aves, pequenos mamíferos, entre outros; ou ainda pela ingestão de água de rios e lagos contendo copépodes infectados, que são ingeridos juntamente à água; e o contato direto com a carne crua contaminada de um hospedeiro intermediário com olhos, mucosas, feridas abertas, especialmente através da utilização de cataplasmas, uma prática comum na medicina tradicional oriental (PAMPIGLIONE et al., 2003). Dessa forma, para evitar a infecção, deve-se ingerir carne bem passada, água tratada e não permitir contato de mucosas com carnes cruas. A carne contaminada congelada a -12°C por pelo menos 5 dias ou bem cozida elimina o parasito (KUCHTA et al., 2020).

Águas de estação de tratamento também podem ser fontes de infecção e devem ser monitoradas frequentemente. Em uma estação de tratamento de água

potável na Malásia, ovos de *Spirometra* sp. foram encontrados na água não tratada, no entanto na planta final, onde a água estava totalmente tratada e nos canais de distribuição, essas formas estavam ausentes (RICHARD et al., 2016).

A esparganose humana tem sido relatada em várias partes do mundo. O primeiro caso humano foi diagnosticado na China, em 1882. Existem mais de 1600 casos registrados, com a maioria na China, concentrando mais de mil casos (LU et al., 2014), seguido por Japão (400 casos), Coreia (119 casos), Tailândia (52 casos), países do sudeste asiático (Indonésia, Laos, Filipinas, Vietnam), Índia, Estados Unidos, e com menor frequência na América do Sul, Europa, e África (LIU et al., 2015b). Ocorre com mais frequência na Ásia por algumas tradições regionais estarem associadas a fatores de risco, como ingestão de pratos exóticos contendo carne de anfíbios e répteis, e práticas como tratamentos com cataplasmas (LESCANO e ZUNT, 2013). Um estudo realizado em 2015 registra 11 casos na Europa (República Tcheca, França e Itália), 16 casos na América do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Panamá, Paraguai, Uruguai e Venezuela), 30 casos na África (Congo, Gabão, Kenya, Libéria, Madagascar, Tanzânia, Uganda, Zimbábue), 4 casos na Austrália e em torno de 70 casos nos Estados Unidos, além de alguns casos na América Central (Caribe, Belize e Porto Rico) (KUCHTA et al., 2015).

Um inventário realizado com 1061 casos de esparganose em humanos entre 1959 e 2012, na China, o país que concentra 60% de todos os casos já registrados, mostrou que em 43,1% dos casos a larva se instalou no tecido subcutâneo ou muscular, 31% nos olhos, 17,9% no sistema nervoso central (SNC), 3,9% no trato gênito-urinário e 3,2% em vísceras. Quanto aos fatores de risco associados, 54,6% dos casos foram transmitidos através de contato, 33,8% por via alimentar e 11,5% pela ingestão de água contaminada. Quando confrontados o local de alojamento da larva e o modo de transmissão, a maioria dos casos de ocorrência no SNC e outras vísceras (70% e 82,8%) foram transmitidas através de ingestão de carne crua ou mal passada de hospedeiros infectados. Essa forma de infecção também foi responsável pela maioria dos casos em que a larva se aloja no tecido subcutâneo ou muscular de abdômen ou membros inferiores (62,7% e 62,9%); quando nos membros superiores, região maxila-facial e olhos, a transmissão se dá principalmente por contato direto (76,9%, 90,4%, 90,1% respectivamente). Esse estudo também revelou que a

forma de transmissão predominante naquela região vem caindo com o passar do tempo, sendo que até o ano de 1979, 83,8% eram transmitidos por contato e que esse número em relação aos casos após o ano 2000 representa 18,1% dos casos, enquanto que a transmissão alimentar aumentou de 7,3% até 1979 para 63,9% após 2000; também houve pequeno aumento em relação à ingestão de água contaminada, de 8,9% para 11,5%. A espécie dominante nessa região é de *S. erinaceieuropaei* (LU et al., 2014).

Na Tailândia, entre 1943 e 2004, foram registrados 34 casos de esparganose humana (WIWANITKIT, 2005). Em quatorze casos foram identificados fatores de risco, sendo doze com histórico de ingestão de água contaminada, cinco com histórico de ingestão de carne de anfíbio ou réptil e dois casos com histórico de uso de cataplasmas (alguns casos apresentaram mais de um fator de risco envolvido). A larva se alojou na região ocular em dezessete casos, dez no tecido subcutâneo, cinco no SNC, um na orelha, um no pulmão, um intraperitoneal e um intraósseo, sendo este o único caso já reportado (WIWANITKIT, 2005). Ainda na Tailândia, outros 52 casos registrados, 27 foram atribuídos a mulheres, e quinze a homens; nos demais casos não havia registro de sexo. A maioria dos pacientes apresentava apenas uma lesão causada pelo espargano, três deles, dois esparganos e dois pacientes, três lesões; as lesões no tecido subcutâneo representaram a maioria dos casos (46%), as lesões oculares representaram aproximadamente 1/3 dos casos (34,6%) e 13% estavam alojados no cérebro, e também haviam registros em locais raros, como em ovário, pulmões, e mucosa labial. Assim como, no trabalho descrito por LU et al. (2014) na China, os casos de esparganose ocular representavam 51,7% até o ano de 1990, reduzindo drasticamente para 13% após esse período, o que o autor atribui à redução de práticas de medicina tradicional como cataplasmas de anfíbios frescos para tratamento dos olhos (ANANTAPHRUTI et al., 2011).

Estudos em diversos países como Itália, Japão e Gana, registraram fatores de risco similares como ingestão de carne crua de hospedeiros como javalis, anfíbios, répteis, e ingestão de água sem tratamento (LEE et al., 2010; LIU et al., 2015a; SONG et al., 2015; KIM et al., 2017; KUDO et al., 2017).

Na Coreia, um trabalho desenvolvido com 50 casos de esparganose humana identificou 35 casos de plerocercoides de *S. erinaceieuropaei* e 15 casos de *S. decipiens*, entre 1979 e 2009. Esse estudo utilizou materiais que se

encontravam armazenados em institutos de pesquisa e hospitais de diversas regiões da Coreia (JEON et al., 2015).

Um inquérito sorológico na Coreia revelou que a soropositividade para esparganose foi cinco vezes maior no homens (3,4%) do que nas mulheres (0,7%), devido a hábitos alimentares e atividades masculinas (LEE et al., 2016).

Sugere-se que essa parasitose também possa ter transmissão vertical, devido o relato de um bebê recém nascido diagnosticado com um espargano medindo em torno de 475mm do tecido subcutâneo próximo à orelha esquerda (LU et al., 2014).

No Brasil, há quatro casos humanos registrados: o primeiro no Rio Grande do Sul, em 1967 (FROES, 1967), dois no estado de São Paulo em 1968 (MACIEL e HADDAD, 1968) e 1996 (GOMES et al., 1996) e um em Santa Catarina em 2011 (MENTZ et al., 2011). O caso mais recente, se tratou de esparganose ocular, e foram retirados três plerocercoides por excisão cirúrgica; um deles apresentou migração frequente ao longo de dois anos, passando pela região periocular, e subpalpebral (MENTZ et al., 2011). No penultimo caso (GOMES et al., 1996), em uma zona rural no interior do estado de São Paulo, a paciente apresentava dores abdominais, febre, mal estar, náuseas e vômitos, além de processo inflamatório na região umbilical. O parasito foi identificado como plerocercóide de *Spirometra*. A paciente também apresentava peritonite difusa porém não foi encontrado mais nenhum exemplar embora houvesse perfuração do intestino delgado. O hemograma apresentou eosinofilia acentuada (GOMES et al., 1996). Ambos os casos foram de residentes em zona rural, com histórico de ingestão de carne crua de porco, como salsicha, linguiça e toucinho, além de carne de caça de paca, quati e tatu, e consumo de água de nascentes e sem tratamento (MENTZ et al., 2011; GOMES et al., 1996).

A literatura cita grande quantidade de hospedeiros, em várias regiões do mundo, incluindo macaco (*Macaca fascicularis*), na Espanha (importado das Ilhas Maurício) (BAUCHET et al., 2013), javalis (*Sus scrofa*) provenientes de caça, na Polônia (SOBOCINSKA et al., 2016), Javali Africano do Deserto (*Phacochoerus aethiopicus*) na Tanzânia (OPUNI e MULLER, 1974; OPUNI e MULLER, 1975), anfíbios (*Rana limnocharis* e *Rana nigromaculata*, *R. rugulosa*, *R. temporaria*) répteis (*Ptyas dhumnades*, *Elaphe carinata*, *Elaphe taeniura*, *Elaphe*

quadrivirgata, *Enhydris chinensis*) na China (ZHANG et al., 2014, LIU et al., 2015a; CHEN et al., 2022) e no Japão (HATSUSHIKA e OKINO, 1987), anfíbios (*Rana rugulosa*, *R. tigrina*) em Myanmar (JEON et al., 2018b), répteis das espécies *Natrix tessellata* e *Macrovipera lebetina*, na Armênia (NELLI et al., 2014), cobras “russell’s black viper” na Índia (KAVITHA et al., 2013), cobras (*Ptyas korros*) em Laos e na Tailândia, sapos (*Hoplobatrachus rugulosus*), em Myanmar (JONGTHAWIN et al., 2014), raposas (*Vulpes vulpes*) na Austrália, cobras (*Chilabothrus angulifer* e *Cubophis cantherigerus*) em Cuba (MORALES et al., 2022), uma cobra (*Naja samarensis*) nos Estados Unidos, espécime importado das Filipinas (VEROCAI et al., 2023) entre outros, com infecções frequentes na região subcutânea, muscular e cavidade abdominal.

Quanto a distribuição geográfica e hospedeiros descritos das espécies de *Spirometra* confrontadas com as análises filogenéticas, algumas das seis linhagens mostram-se bem definidas (KUCHTA et al., 2020): *S. decipiens* complex 1 e *S. decipiens* complex 2 foram encontradas apenas nas Américas, do Norte e do Sul (ALMEIDA et al., 2016). Enquanto *S. decipiens* complex 1 parasita canídeos e felídeos, e causa esparganose em humanos, *S. decipiens* complex 2 até o momento não foi descrita como causadora da zoonose. No sudeste asiático, a maioria das ocorrências de casos, tanto humanos quanto em animais, são causados por *S. mansoni*, que também já foi descrita em espécies de hospedeiros silvestres na África, Austrália e Leste Europeu (KUCHTA et al., 2020). Recentemente, BRABEC et al. (2022) identificaram *S. mansoni* em um cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) na Colômbia. Esse hospedeiro é presente em toda a América Central e do Sul, desde o Panamá até a Argentina, possibilitando a presença de *S. mansoni* por toda a região (BRABEC et al., 2022). KUCHTA et al. (2020) também relataram que *S. erinaceieuropaei* parece estar restrita à Europa, e que trabalhos anteriores que implicavam sua ocorrência na Austrália e Ásia foram identificados erroneamente, se tratando na verdade de *S. mansoni*, além de *S. folium* restrita a algumas regiões da África.

Diversos estudos sobre a prevalência de plerocercoides de *Spirometra* têm sido conduzidos, revelando grandes variações: um estudo com martas (*Martes martes*) capturadas em armadilhas numa região com duas pequenas lagoas na Ucrânia revelou prevalência de 36,8% de plerocercoides nas carcaças, com média de quatro a cinco esparganos por animal (RUBTSOVA e HECKMANN,

2020). Em uma pesquisa para determinar a prevalência de infecção por plerocercoides em anfíbios na China, obteve-se uma prevalência de 16,23% nas espécies *R. nigromaculata* (14,85%), *R. limmochari* (20,82%) e *R. temporária* (10,91%) (ZHANG et al., 2015b). Nesse mesmo país, outros trabalhos com anfíbios mostraram que ela varia de 3,2% a 90,9%, também ocorrem casos de esparganose em aves, répteis, roedores e suídeos (LI et al., 2011). Um estudo na Austrália revelou 4,9% de anfíbios das espécies *Litoria gracilenta*, *L. peronii*, *L. aurea* e *L. caerulea* infectados por plerocercoides. Nesse caso foi realizado sequenciamento do gene *cox1* que determinou a espécie *S. erinacei* (= *S. erinaceieuropaei*) (BERGER et al., 2009). Na Polônia, um estudo para verificar a distribuição de esparganose em uma comunidade de carnívoros selvagens examinou a carcaça de 583 animais e obteve prevalência de 29,5% entre as espécies examinadas. A média de intensidade de infecção foi de 14,1 plerocercoides por animal. Os materiais recuperados tiveram o gene nuclear 18S rRNA sequenciados e foi identificado como *S. erinaceieuropaei*. As espécies hospedeiras foram cão-guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*), texugo europeu (*Meles meles*), marta (*Martes martes*), fuinha (*Martes foina*), furão (*Mustela putorius*), vison (*Neovison vison*) e o lince (*Lynx lynx*) (KONDZIOR et al., 2020). Em serpentes não nativas (*Boiga irregularis*) de Guam, uma ilha isolada no Pacífico, 77,5% delas apresentaram *Spirometra erinaceieuropaei* (HOLLDORF et al., 2015).

No Sri Lanka, foi revelada uma prevalência de 37,5% de *S. erinaceieuropaei* em anfíbios das espécies *Truga eques* e *Minverya Agricola* (SILVA et al., 2022).

Dados verificados em carcaças e animais disponíveis para consumo em mercados revelaram dados preocupantes. Uma pesquisa com 456 serpentes vivas ou congeladas disponíveis para consumo, realizada em um mercado de alimentos na China, revelou prevalência de 55% com média de 12,5 plerocercoides por serpente examinada, com presença de plerocercoides em cobras das espécies *Deinagkistrodon acutus* (60%), *Bungarus multicinctus* (7,7%), *Naja atra* (14,3%), *Dinodon rufozonatum* (79,5%), *Elaphe carinata* (63,6%), *E. taeniura* (15,4%), *Ptyas korros* (40%), *P. mucosus* (81,6%), *Xenochophis piscator* (79,4%), *Zoacys dhumnades* (96,2%). Outra investigação com anfíbios nesse mesmo país obteve 11,8% de prevalência nas espécies *Rana*

tigrina rugulosa e *R. limnocharis* (HONG et al., 2016). Os autores chamaram a atenção para o alto risco do consumo de répteis e anfíbios (WANG et al., 2014; HONG et al., 2016). Em serpentes (*Dendrelaphis pictus*) de um mercado na Indonésia, a prevalência foi de 50,85%, sendo que naquelas de cativeiro a prevalência foi de 48,7% e nas selvagens de 70,7%. A maioria dos plerocercoides estavam na musculatura (56,6%) seguido pelo tecido subcutâneo (29,5%) e 13,8% na cavidade celomática (YUDHANA et al., 2019). No mesmo mercado, lagartos da espécie *Varanus salvator* apresentaram 69,64% de prevalência, sendo que 71,24% dos plerocercoides estavam no tecido muscular e 28,75% no subcutâneo (YUDHANA et al., 2021). Também na Indonésia, outro mercado apresentou prevalência de 9,1% de anfíbios (*Rana rugulosa*) com plerocercoides (YUDHANA et al., 2020).

A esparganose proliferativa, caracterizada pela disseminação extensiva de esparganos pelos tecidos do hospedeiro associado à inflamação grave, é rara, mas geralmente fatal. Atribuída ao agente causador *Sparganum proliferum*, apresenta a mesma morfologia da larva de *Spirometra*, porém é caracterizada por replicação assexual por divisão. O ciclo de vida do *S. proliferum*, incluindo seu hospedeiro definitivo é desconhecido (LESCANO & ZUNT, 2013). Na Austrália há registros de esparganose proliferava em cães: cinco casos sem identificação da espécie (BEVERIDGE et al., 1998) e um durante uma toracotomia exploratória, onde foram observados numerosos nódulos brancos, presentes ao longo do mediastino, pleura parietal e lobos pulmonares, que mediam de 2 a 4mm e eram de consistência granulosa. Nesse caso, os plerocercoides recuperados foram submetidos a análise molecular e identificados como *Spirometra erinacei* (= *S. erinaceieuropaei*) (SIMPSON et al., 2012).

No Brasil, foram encontrados plerocercoides em diversas espécies de anfíbios (*Bufo* sp., *Bufo crucifer*, *Leptodactylus ocellatus*, *Hyla faber*, *Dermatonotus muelleri*), répteis (*Herpetodryas carinatus*, *H. fuscus*, *Ameiva ameiva*, *Bothrops* sp., *Pseudalopex gymnocercus*, *Drymarchon corais*, *Crotalus durissus* e *Dryadophia bifossatus*), em cuíca (*Phylander opossum*) (FORTES e HOFFMANN, 1987; REGO e SCHAFFER, 1992; BEZERRA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2016; TOLEDO et al., 2022).

Na região do Salobra no Pantanal, Mato Grosso do Sul (MS), no ano de 1942, foram coletados plerocercoides de *Spirometra* em duas cuícas (*Phylander*

opossum), lagartos (*Ameiva ameiva*), serpentes (*Bothrops* sp.) e em graxaim do campo (*Pseudalopex gymnocercus*), (GOMES, 1984; REGO & SCHAFFER, 1992) e no município de Bodoquena-MS, em serpentes (*Drymarchon corais*) (REGO & SCHAFFER, 1992).

No Quadro 1 em anexo, estão compiladas as informações sobre os locais de ocorrência da esparganose, as espécies animais hospedeiras associadas à doença, além da prevalência observada, sempre que disponível, proporcionando uma visão abrangente sobre a distribuição geográfica e histórica da esparganose.

2.3.3 Quadro Clínico e Patológico

Camundongos infectados experimentalmente demonstraram que os plerocercoides penetram através do estômago ou duodeno, passam pela cavidade abdominal e migram para a musculatura esquelética ou tecido subcutâneo, onde tipicamente se desenvolvem em um nódulo (HONG et al., 1989). A resposta característica inclui infiltrado inflamatório celular na primeira semana, formação de túneis por onde a larva migrou, na segunda semana e, após quatro semanas a seis meses, ocorre proliferação fibroblástica.

A migração do parasito no corpo do hospedeiro é muito rápida. Em infecções experimentais realizadas por OPUNI & MULLER (1975), foi demonstrado que após 45 minutos em ratos, e 120 minutos em um macaco, as larvas já haviam atravessado a parede duodenal, o que pode explicar a resposta imune inicial escassa do hospedeiro.

A esparganose pode ser vista encapsulada ou degenerativa, causando diversos graus de fibrose proliferava com infiltrado celular peculiar (KAVITHA et al., 2013).

Em macacos (*Macaca fascicularis*) acometidos por esparganose, exames hematológicos revelaram leucocitose, neutrofilia e eosinofilia. Biópsias das nodulações mostraram lesões inflamatórias e encapsuladas, contendo ao centro o organismo envolto por macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, envolvidos por cápsula fibrosa misturada com linfócitos e células plasmáticas. Os aspirados dos nódulos apresentaram linfadenite neutrofílica subaguda (BAUCHET et al., 2013).

Em um estudo com anfíbios realizado na Austrália, os animais apresentaram infecção severa, e os autores sugerem que altas infecções por

594 plerocercoides ou imunossupressão secundária a outros problemas de saúde
595 podem causar imunodepressão e desencadear problemas graves (BERGER et
596 al., 2009). Fígados de anfíbios foram avaliados histologicamente, revelando
597 lesões mecânicas devido ao rompimento do parênquima através da passagem
598 migratória das larvas através desse órgão. No trajeto da larva, formava-se um
599 túnel que gradativamente era substituído por tecido conjuntivo de proliferação
600 (REGO & SCHAFFER, 1992).

601 Os sinais clínicos no homem são variáveis e inespecíficos, e estão
602 associados ao local por onde a larva migrou e se alojou, podendo ser encontrada
603 em qualquer parte do organismo (KUCHTA et al., 2015). O tecido subcutâneo é o
604 local mais comum na esparganose humana (KUCHTA et al., 2015), onde podem
605 ocorrer migrações, geralmente indolores, com reaparecimento em outro local,
606 podendo também causar dor e inflamação local (LEE et al., 2010; HA E OH,
607 2011). Os esparganos podem permanecer viáveis por até 20 anos (LEE et al.,
608 2010).

609 Em alguns casos, o plerocercóide migra pelos tecidos do hospedeiro,
610 apresentando-se ora em uma parte do corpo, ora em outra (PAMPIGLIONE et al.,
611 2003; LEE et al., 2010), ou desaparecendo e reaparecendo (KUCHTA et al.,
612 2015).

613 Exames histopatológicos de tecidos próximos ao espargano em humanos,
614 mostraram uma reação tecidual característica. Ao longo do trajeto que o parasito
615 faz no tecido do hospedeiro, este se apresenta destruído e necrótico, com
616 numerosos debris nucleares, deposição de fibrina e células inflamatórias.
617 Geralmente, a esparganose não é encapsulada e o parasito se desprende da
618 lesão sem o tecido aderido. Os corpos calcários presentes na superfície do
619 plerocercóide são ocasionalmente encontrados no citoplasma dos macrófagos ou
620 células gigantes multinucleadas. Esse achado, associado às lesões de túnel,
621 formados pela migração do espargano, é bastante característico, e de grande
622 valia no diagnóstico, principalmente na ausência do parasito (CHI et al., 1980).

623 A esparganose subcutânea é a forma de apresentação mais comum. O
624 espargano migra pelo tecido subcutâneo e músculos superficiais, como parede
625 abdominal, escroto e extremidades inferiores, manifestando-se como um nódulo
626 com diâmetro em torno de 1 a 2cm, algumas vezes dolorido, inflamado e móvel.

Diagnósticos diferencias incluem lipoma, fibroma, cisto sebáceo (KUCHTA et al., 2015).

A esparganose ocular, por sua vez, está associada à migração larval no tecido subconjuntivo, conjuntivo e órbita, quase sempre atribuída à aplicação de cataplasmas nos olhos, sendo mais frequente na Ásia devido a fatores culturais. Pode causar edema, exoftalmia do globo ocular, lagoftalmia, ptose, irritação, lacrimejamento, ardência, celulite orbital, podendo, se não tratada, levar à cegueira (FABIAN et al., 2015; KUCHTA et al., 2015). Algumas vezes pode ser confundida com tumor (NATH e GOGOI, 2015), e sempre é necessário um escaneamento de corpo inteiro para verificar se há mais larvas (KLEEBAYOON & WIWANITKIT, 2023)

A esparganose visceral resulta em danos e/ou mau funcionamento do órgão ou tecido em que a larva se alojou. Pode causar obstrução ou peritonite quando perfura a parede intestinal e cistite na bexiga (KUCHTA et al., 2015). Em uma investigação clínica com 40 casos de esparganose pulmonar em humanos, os primeiros sintomas foram tosse, febre e dor no peito; muitos casos apresentaram expectoração de catarro esbranquiçado, e apenas três exibiram nódulos visíveis em radiografia. Havia eosinofilia e proteína C reativa elevada, com IgE total elevada em 37,5% dos pacientes. Foram investigados pneumonia bacteriana, tuberculose, câncer de pulmão e pneumonia eosinofílica (LI et al., 2015). Em testículos, pode apresentar assimetria, sem outros sinais clínicos, ou sintomas como febre, dor e edema na região inguinal. O plerocercóide é envolto por infiltrado eosinofílico e ocorrem células epitelióides e fibroblastos em volta dos túneis. São observados muitos eosinófilos, linfócitos, células plasmáticas, polimorfonucleares, e algumas células gigantes infiltradas, linfadenopatia eosinofílica, e em lesões mais antigas, fibrose pericapsular, proliferação granulomatosa, caracterizando quadro de orquite e epididimite (SAKAMOTO et al., 2003; SABU et al., 2014). Em mamas, alguns casos não apresentaram sinais clínicos, exceto pela presença do nódulo. Geralmente suspeita-se clinicamente de tumor, sendo indicados exames de imagem como mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética, e posterior remoção cirúrgica. Em um caso foi observado uma massa tortuosa e tubular (Mamografia), imóvel e vascularizada (Doppler), com sinais de alta intensidade contendo formas de folhetos tubulares (ressonância magnética). Após remoção, e realização de biópsias, revelou-se

tecido intersticial com grande quantidade de linfócitos e eosinófilos, caracterizando inflamação crônica (SONG et al., 2015; ZUO et al., 2018).

A neuroesparganose envolve o alojamento da larva nos hemisférios cerebrais, medula e cerebelo. Pode ocasionar diversos sintomas neurológicos, como fadiga, fraqueza motora, confusão, dor de cabeça, convulsões, perda de memória, coma, febre, parestesia e isquemia, sendo que convulsões, hemiparesia e dor de cabeça estão presentes na maioria dos casos. Oito por cento dos casos na China são relacionados ao SNC. Um espargano morto ou degenerado pode resultar em uma massa calcificada e levar a hemorragia intraventricular, granuloma, atrofia cortical, entre outros (FINSTERER & AUER, 2013). Em um investigação clínica com dezoito casos de esparganose cerebral em crianças, o quadro clínico era similar a casos de tumores cerebrais, apresentando dor de cabeça, convulsões, fraqueza e dormência de membros, tontura, vômito em jato, visão turva, contração da boca e paralisia. Sessenta e seis vírgula sessenta e sete por cento (66,67%) tinham apenas uma lesão e 33,33% apresentaram múltiplas lesões causadas pela esparganose. A citologia do fluido cerebroespinal era linfocítica ou eosinofílica. Exames pela técnica de ELISA anti-esparganose foram reagentes em 100% dos casos. Quatro casos foram erroneamente diagnosticados como tumor cerebral e encaminhados para cirurgia. Os demais quatorze casos foram tratados com Praziquantel. Os autores destacaram a importância de diagnósticos por imagem quando existe a suspeita diagnóstica e que a associação de ELISA com ressonância magnética leva a um diagnóstico confiável para esparganose cerebral (GONG et al., 2012, KUČHTA et al., 2015).

2.3.4 Resposta imune

Os helmintos podem sobreviver por anos em hospedeiros mamíferos, provavelmente desenvolvendo mecanismos para neutralizar o sistema imunológico do hospedeiro, e é evidente que os plerocercoides de *S. erinaceieuropaei* o fazem liberando fatores supressores que reduzem a resposta inflamatória do hospedeiro (FUKUMOTO et al., 1997).

A esparganose é caracterizada pela presença do parasito e de lesões granulomatosas que o envolvem, além dos caminhos tortuosos de migração do espargano (CHI et al., 1980).

As proteases excretórias/secretórias (ES) do plerocercóide degradam a matriz extracelular de colágeno, fibronectina e miosina, resultando em dano tecidual e facilitando sua migração através dos tecidos. Pelo menos quatro proteases demonstram capacidade de degradar o colágeno (KONG et al., 1994). Essas proteases, também são potentes fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos (SILE-LUCAS e HEMPHILL, 2002).

Proteínas séricas produzidas pelo plerocercóide foram avaliadas: uma similar à tripsina (198 e 104 kDa) com atividade colagenolítica, e outra, uma quimiotripsina com 36kDa capaz de clivar o interferon-gama recombinante humano e mielina bovina (YANG et al., 2015), além da proteína antigênica 29kDa (SILE-LUCAS e HEMPHILL, 2002). Esses estudos ainda indicaram que todas as proteínas purificadas e analisadas induzem fortes respostas imunes em pacientes infectados, sugerindo que são potenciais antígenos para diagnóstico sorológico da esparganose humana (YANG et al., 2015; SILE-LUCAS e HEMPHILL, 2002). Outra proteína secretada pelo plerocercóide, a proteinase cisteína de 27kDa é capaz de clivar o IgG humano *in vitro* e ser reconhecida pelo IgE do paciente, sugerindo que essa protease atue no processo de evasão do sistema imune. Além disso, a protease cisteína 53kDa que induz resposta de IgE específica em pacientes humanos, também foi isolada (SILE-LUCAS e HEMPHILL, 2002).

Os plerocercóides produzem e liberam prostaglandinas (PGE2 α), que parecem modular as funções dos macrófagos e linfócitos do hospedeiro através do aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico. Isso pode não apenas auxiliar na evasão do sistema imune do hospedeiro, como também na penetração e migração, contribuindo para a ocorrência da esparganose. Quando a porção anterior da larva migra do intestino para o peritônio, ela pode transportar bactérias para a cavidade abdominal, ativando macrófagos através da produção de lipossacarídeos bacterianos (LPS), conhecidos como potentes ativadores do sistema imune, que induzem inflamação local e sepse. Isso causa múltiplos efeitos nos macrófagos, incluindo a indução e secreção de mediadores inflamatórios como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (FNT). A IL-1 estimula proteínas hepáticas de fase aguda, resposta linfocitária e produção de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico (ON), prostaglandina (PG) e a própria IL-1. Produtos ES dos plerocercóides são potentes inibidores do LPS induzido por IL-1 em macrófagos (DIRGAHAYU et al., 2004).

Existem evidências de que o ON contribui para a defesa do hospedeiro nas funções dos fagócitos mononucleares. Estudos demonstraram que os produtos ES são potentes inibidores da geração de nitritos e da indução de síntese de óxido nítrico (iNOS) assim como a expressão da quimiocina mRNA em macrófagos de ratos (FUKUMOTO et al., 1997). Especula-se que seu principal papel seja a diminuição da regulação pró-inflamatória nas células imunocompetentes do hospedeiro (SILE-LUCAS e HEMPHILL, 2002).

Os plerocercoides são reconhecidos por sua habilidade de produzir substâncias que se ligam e ativam os receptores do hormônio do crescimento (GH), resultando em crescimento acelerado de seu hospedeiro. A esparganose estimula a incorporação de 3H-thymidina ou sulfato-35S nas cartilagens costais de camundongos, resultando na proliferação da cartilagem. Essa substância é conhecida por Fator de Crescimento Plerocercóide (PGF) e é considerada análoga às ações do GH do hospedeiro (HIRAI, 1997). Sua atividade ainda não foi bem compreendida, mas ilustra o impacto que o plerocercóide causa no seu hospedeiro intermediário, paratênico ou acidental (SCHOLZ et al., 2019). Esse e outros fatores produzidos pelo plerocercóide provavelmente são responsáveis pela invasão e fuga do sistema imune do hospedeiro (HIRAI, 1997), podendo suprimir a resposta imune a seu favor e auxiliar na invasão tecidual e possível evasão do sistema imune (SILE-LUCAS e HEMPHILL, 2002).

Análises minerais desse estágio do parasito revelaram presença de corpos de calcário de tamanho médio de 15µm, no escólice e no colo, estando ou aderidos, ou na superfície do tegumento. O escólice e o tegumento são revestidos por moderada quantidade de magnésio, fósforo e íons de cálcio. Os corpos calcários apresentaram altos níveis de íons de cálcio, presença de fósforo e enxofre, enquanto na superfície há níveis moderados de fósforo e cálcio. Esses achados evidenciam que os plerocercoides apresentam estrutura firme e sólida. (RUBTSOVA e HECKMANN, 2020).

2.3.5 Diagnóstico e Identificação da espécie

Em humanos, testes imunológicos sorológicos estão disponíveis e são valiosos complementos para o diagnóstico de esparganose, embora possa ocorrer reação cruzada com outros cestodas. Um teste ELISA para detectar IgG

anti *S. mansoni* apresenta 100% de sensibilidade e 97% de especificidade (LESCANO e ZUNT, 2013; KUCHTA et al., 2020).

Em alguns casos, principalmente em humanos, o diagnóstico só é realizado após excisão cirúrgica e posterior visualização e identificação do parasito (NATH e GOGOI, 2015).

A melhor maneira de identificação em nível de espécie através dos caracteres morfológicos presentes na fase adulta, e em casos de esparganose, é recomendável realizar a infecção experimental em um hospedeiro susceptível para examinar o parasito na fase adulta (REGO e SCHAFFER, 1992; CDC, 2011), a exemplo de Jeon et al. (2018b) que identificaram espécies de plerocercoides de *Spirometra* em Myanmar, coletando plerocercoides em anfíbios e induzindo infecção experimental em um cão. A partir do verme adulto recuperado, foram realizadas colorações em carmim e cortes histológicos longitudinais corados por Hematoxilina & Eosina, além de identificação molecular pelos genes mitocondriais *cox1* e *nad1*. Em um estudo com 50 casos humanos de esparganose realizado na Coreia, foi utilizado sequenciamento do gene mitocondrial *cox1* para determinar a espécie envolvida. No mesmo trabalho, induziu-se infecção experimental com plerocercóide de *S. decipiens*, recuperado de uma serpente (*Rhabdophis tigrinus tigrinus*) e de *S. erinaceieuropaei*, recuperado de um homem, em um gato e em um cão, respectivamente, para identificação e descrição morfológica e molecular dessas espécies (JEON et al., 2015).

A identificação da espécie através de técnicas moleculares tem sido cada vez mais empregada para identificação de *Spirometra*. DNA extraído e amplificação dos genes *cox1*, *cox3*, *nad4* e rRNA 18S já foram utilizados para identificação de *S. erinaceieuropaei* e *S. decipiens*. Na maioria das vezes, é utilizado apenas o sequenciamento parcial do gene *cox1* (BAUCHET et al., 2013; BOONYASIRI et al., 2014; JEON et al., 2015; SOBOCINSKA et al., 2016; KUDO et al., 2017; SILVA et al., 2022).

O emprego de técnicas moleculares também é uma ferramenta importante para o entendimento epidemiológico. Por exemplo, JEON et al. (2016b), que relataram 50 casos humanos na Coreia, entre 1979 a 2009, sendo que 35 foram identificados como *S. erinaceieuropaei* e 15 como *S. decipiens*. Nessa pesquisa, foi investigada se a fonte de infecção para as duas espécies de *Spirometra* seriam as mesmas, e assim, os autores analisaram molecularmente 904 esparganos

recuperados de 283 serpente (*Rhabdophis tigrinus tigrinus*, *Dinodon rufozonatum rufozonatum*, *Elaphe davidi*, *Elaphe schrenkii*, *Agkistrodon saxatilis*), e todas elas, sem exceção, apresentaram infecção por esparganos identificados como *S. decipiens*, o que sugere que os casos humanos causados por *S. erinaceieuropaei* possam ter como fator de risco principal a ingestão de água.

O tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 4 meses (BOONYASIRI et al., 2014).

2.3.6 Tratamento de esparganose

Tratamentos com praziquantel e mebendazol nas formas imaturas do parasita não são eficazes (BAUCHET et al., 2013; LESCANO e ZUNT, 2013; LI et al., 2015).

A excisão cirúrgica do parasito é o tratamento de eleição para esparganose (FINSTERER e AUER, 2013; Lescano e Zunt, 2013) e foi aplicada em vários casos humanos (FABIAN et al., 2015; NATH e GOGOI, 2015; SONG et al., 2015).

2.4 *Spirometra* adulto

2.4.1 Características morfológicas:

A única maneira de identificar a espécie morfológicamente é na fase adulta, e em casos de esparganose, preferencialmente deve-se realizar a infecção experimental em um hospedeiro susceptível para examinar o parasito nessa fase (REGO e SCHAFFER, 1992; CDC, 2011).

Alguns autores utilizaram infecção experimental em cães e gatos para induzir o desenvolvimento do parasito adulto e determinar a espécie de plerocercoides que infectaram hospedeiros humanos e animais, através de análises morfológicas e moleculares (JEON et al., 2015; ZHANG et al., 2015b) A principal característica distintiva entre as espécies de *Spirometra* é o número de circunvoluções do útero que só é desenvolvido na fase adulta do parasito e nas proglótides maduras (JEON et al., 2018a).

Genericamente, o parasito mede em torno de 60 a 110cm de comprimento e 0,5 a 0,8 cm de largura. O escólice é alongado e elíptico, com dois sulcos de sucção chamados bótrias; o colo é fino e não segmentado (LIN et al., 2010). O estróbilo é composto por aproximadamente mil proglótides, sendo as maduras com formato retangular (0,9 a 2,3mm de comprimento por 6 a 10mm de largura) (LIU et al., 2015b).

Cada proglótide possui o sistema reprodutor masculino e feminino. O masculino consiste em centenas de testículos e o feminino em um ovário bilobado e o útero contorcido. Em algumas espécies, o útero é contorcido ou em formato de “S”, como em *S. erinaceieuropaei* ou em formato de “C”, como em *S. mansonioides* (LIU et al., 2015b).

Geralmente as características morfológicas e morfométricas do estróbilo, como proglótides, número de voltas do útero, ovários, testículos, folículos vitelinos, saco do cirro e vesícula seminal são muito variáveis intra e interespecificamente, podendo variar até mesmo no mesmo exemplar, tornando um grande desafio (KUCHTA et al., 2024).

Diferentes trabalhos (KUCHTA & SCHOLZ, 2017; SCHOLZ et al., 2019; KUCHTA et al., 2024) concluíram que a identificação específica baseada apenas em caracteres morfológicos não é viável. Os autores observaram fragilidades no diagnostico morfológico na literatura existente sobre o gênero *Spirometra*, levando a confusão atual em sua taxonomia, muitas vezes porque o material examinado geralmente é coletado em carcaças em decomposição, a fixação dos espécimes é inadequada assim como ocorre rápida degradação do parasita após a morte do hospedeiro, resultando em dados imprecisos, impedindo identificações confiáveis.

2.4.2 Epidemiologia

Na China, foram registrados casos de vermes adultos de *S. erinaceieuropaei* no intestino de felídeos selvagens como o tigre (*Panthera tigris*), o gato-de-bengala (*Prionailurus bengalensis*), e o gato selvagem (*Felis silvestris*) (CHEN et al., 2022). Em uma província chinesa, ovos de *S. mansoni* foram encontrados em 19% dos cães e 33% dos gatos pesquisados (LESCANO e ZUNT, 2013). Também na China, a mesma espécie apresentou prevalência de

27,5% em cães e em 40,5% dos gatos avaliados através de exames coproparasitológicos (HONG et al., 2016).

Na Coreia, um gato de rua atropelado apresentou alta infecção, com 134 espécimes do parasito adulto recuperados em seu intestino. A identificação morfológica por microscopia, com coloração em carmim e análise molecular utilizando gene *cox1*, confirmaram que se tratava de *S. decipiens* (JEON et al., 2018a). Dois gatos no mesmo país tiveram manifestações clínicas quando foram isolados espécimes adultos identificados como *Spirometra* sp. 1 (KIM et al., 2021).

Na Índia, um cão foi diagnosticado com *S. erinaceieuropaei* após excretar segmentos do parasita nas fezes e ter histórico de ingestão de anfíbios, embora não apresentasse sinais clínicos (SAHOO et al., 2018).

Em Bangladesh, foram encontrados ovos de *Spirometra* sp. nas fezes de um leão (*P. leo*) e de uma civeta (*Civettictis civetta*) (NATH et al., 2021).

No Irã, um gato selvagem (*Felis silvestris*) atropelado, teve o parasito encontrado após necropsia, e após sequenciamento do gene *cox1*, foi identificado como *S. erinaceieuropaei* (BADRI et al., 2017).

Na Grand Cayman, um estudo com 55 gatos mostrou que 18,18% deles estavam infectados com o parasito adulto no intestino. Dentre os infectados, 60% eram fêmeas e 40% machos, o que o autor atribui aos hábitos alimentares maternos das fêmeas, que caçam para alimentar seus filhotes (HEADLEY et al., 2012).

Um estudo na Tanzânia investigou a ocorrência de *Spirometra* em carnívoros. Em 15 amostras de fezes contendo os parasitos, os exames moleculares e morfológicos identificaram a ocorrência de *S. ranarum* em um leopardo (*Panthera pardus*), *S. erinaceieuropaei* em outro leopardo (*P. pardus*) e *S. theileri* em uma hiena (*Crocuta crocuta*), seis leões (*Panthera leo*) e seis leopardos (*P. pardus*) (NDOSI et al., 2020). Em outros relatos nesse mesmo país, um leão (*P. leo*) expeliu partes do estróbila nas fezes, e identificado *S. ranarum* (EOM et al., 2018), e nas fezes de um leopardo (*P. pardus*) e uma hiena (*Crocuta crocuta*), foi detectado *S. theileri* através de exames morfológicos e moleculares (EOM et al., 2019).

Na Itália, amostras de fezes de 139 gatos de rua foram processadas e em dois deles, (1,4%) foram encontrados ovos de *Spirometra* sp. (SPADA et al., 2013).

Na Argentina 15,4% dos graxains-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) examinados (12 de 78) apresentavam *S. erinacei* (= *S. erinaceiueuropaei*) à necropsia. A espécie foi determinada por análise morfológica (SCIOSCIA et al., 2014) e posteriormente teve a sequência parcial (450pb) do gene *cox1* analisada, que resultou em 93% de similaridade com *S. proliferum* e 89% de similaridade com *S. erinaceiueuropaei* (PETRIGH et al., 2015).

Em Cuba, foi detectado *S. decipiens* nas fezes de um cão, cujas amostras recuperadas foram amplificadas por PCR utilizando gene *cox1* (644pb) (MORALES et al. 2022).

Ovos de *S. mansonoides* em fezes são registrados por toda a América, incluindo fezes de gatos em Porto Alegre, Brasil, Equador, Colômbia e Estados Unidos (MUELLER et al., 1975). Na Argentina fezes de um cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) apresentaram ovos de *Spirometra* spp. (VIZCAYCHIPI et al., 2016); no chaco boliviano, um gato-do-mato (*Oncifelis geoffroyi*) e sete jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) (FIORELLO et al., 2006). Inquéritos realizados com felídeos silvestres na Colômbia apontaram prevalência de 36% de ovos de *Spirometra* sp. em fezes de onças pintadas (*Panthera onca*) e jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) (URIBE et al., 2021).

Um inquérito sobre helmintos em 146 gatos de rua necropsiados em Cuiabá, Mato Grosso (MT) revelou uma prevalência de 4,11% de *S. mansonoides*, identificados morfológicamente. Esse achado sugeriu um risco de ocorrência da doença zoonótica na região centro-oeste do Brasil (RAMOS et al., 2013).

Na região sul do Brasil, 61,11% de graxains-do-mato (*Cerdocyon thous*) e 54,55% de graxains-do-campo (*Pseudalopex gymnocercus*) analisados apresentaram *Spirometra* spp. à necropsia (RUAS, 2007).

Em Pelotas, Rio Grande do Sul (RS), um gato doméstico foi diagnosticado com ovos de *Spirometra* sp. através de exame parasitológico de fezes (FERRAZ et al., 2020). Em Porto Alegre, RS, ovos característicos foram encontrados em fezes de seis gatos domésticos e um gato-maracajá (*Leopardus wiedii*)

(MARQUES et al., 2019). Também no RS, um gato-dos-pampas (*Leopardus colocolo*), apresentou ovos de *Spirometra* sp. nas fezes (GRESSLER et al., 2016).

ALMEIDA et al., (2016) coletaram fezes de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) contendo ovos e proglótides de *Spirometra* sp.. Esse material serviu de estudo para elucidar aspectos de relação filogenética entre espécies de *Spirometra* encontradas no Brasil com outros relatados ao redor do mundo.

Em Minas Gerais (MG), na região da Zona da Mata, VIEIRA, (2011) estimou em 20% a prevalência de *Spirometra* sp. nas fezes de *C. thous* examinados. Na região da Serra do Cipó, em MG, CURI et al. (2010) encontraram 10% de lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e 30% *C. thous* infectados com ovos de *Spirometra* sp. Esta mesma espécie de canídeo (*C. thous*) apresentou prevalência de 9,46% na região do semiárido no nordeste do Brasil (SANTOS, 2013).

No quadro 2, no anexo, estão compilados os locais de ocorrência de formas adultas de *Spirometra*, espécie animal hospedeira e prevalência, quando foi descrita.

Casos humanos de infecção por *Spirometra* adulto, conhecidos como espirometrose, são raros (LEE et al., 1984; WANG et al., 2012; SIANTO et al., 2014) e não apresentam sintomas clínicos (SCHOLZ et al., 2019). Contudo, Kuchta et al. (2020) alertaram para a possibilidade de confusão com difilobotríase.

Estudos recentes localizaram coprólitos humanos com idade entre 2.000 e 6.000 anos contendo ovos de *Spirometra* sp., no nordeste do Brasil. Esses coprólitos pertenciam a uma população cuja subsistência incluía a ingestão de pequenos mamíferos, répteis e pássaros. Foram encontrados 70 ovos em 200 µL de sedimento analisado do material reidratado (COSTA et al., 2019). Na mesma região arqueológica, localizada no estado de Pernambuco, quinze coprólitos de grandes e pequenos felinos também apresentaram ovos de *Spirometra* sp. Esses coprólitos tinham idade aproximada entre 400 e 8800 anos (SIANTO et al., 2014).

2.4.3 Sinais clínicos

A maioria dos animais infectados por *Spirometra* não apresentam sintomas específicos (FREDES et al., 2021). Felinos domésticos podem apresentar

diarreia, letargia, anorexia, vômitos esporádicos e dores abdominais, e, ocasionalmente, expulsão do parasito pelo vômito (FERRAZ et al., 2020; GASTON e PABLO, 2021; KIM et al., 2021). Em felinos silvestres, sinais clínicos são raros. Muitas vezes os vermes adultos são identificados apenas durante a necropsia, e, algumas vezes apresentam ovos nas fezes. Em alguns casos há episódios de diarreia, intercalados com fezes normais. O exame histopatológico apresenta eosinofilia na lamina própria do intestino (UGARTE et al., 2005).

Em um dos raros casos humanos de infecção por *Spirometra* adulto, o paciente apresentou histórico de 16 dias com febre, perda de peso, dor epigástrica, sem demais alterações clínicas ou laboratoriais. Após esse período, apresentou sepse (LE et al., 2017). Outro caso humano ocorreu na Coreia, e envolveu dois residentes de um vilarejo, com hábitos de consumo de serpentes e peixes de água doce, que apresentaram dores abdominais intermitentes e desconforto epigástrico (LEE et al., 1984).

Na China, um homem foi diagnosticado simultaneamente com plerocercoides e o verme adulto. Ele relatou a ingestão de doze anfíbios vivos poucos dias antes do início dos sintomas, que incluíam tosse, tontura, dor de cabeça, fadiga, dor abdominal. Exames laboratoriais mostraram eosinofilia e a uma tomografia computadorizada, nodulações no tórax. Exames sorológicos apresentaram resultado IgG *anti-Sparganum mansoni* e ELISA *anti-Sparganum mansoni* IgG4 positivos. O exame coproparasitológico também revelou ovos característicos de *S. mansoni*. Uma semana após o tratamento, não apresentava mais ovos nas fezes, e após dez meses os níveis dos parâmetros hematológicos retornaram para a faixa normal (WANG et al., 2012).

2.4.4 Diagnóstico

Em animais domésticos, a infecção por vermes adultos de *Spirometra* frequentemente é diagnosticada através da presença de ovos no exame coproparasitológico (OPUNI e MULLER, 1974; UGARTE et al., 2005; WANG et al., 2012; SCIOSCIA et al., 2014; GRESSLER et al., 2016; VIZCAYCHIPI et al., 2016; SAHOO et al., 2018; FERRAZ et al., 2020; URIBE et al., 2021; NATH et al., 2021; CHEN et al., 2022).

Em alguns casos, o DNA dos ovos é extraído e sequenciado, como demonstrado nos estudos de NATH et al. (2021) e PETRIGH et al. (2022) que utilizaram a sequência do gene *cox1* para identificar *S. decipiens*.

Embora os animais frequentemente não liberem proglótides visíveis nas fezes (FREDES et al., 2021), alguns podem expelir proglótides pelo vômito ou pelas fezes, permitindo o diagnóstico morfológico e/ou molecular. Por exemplo, um gato na Argentina, foi diagnosticado após expelir um fragmento de cestoda pelo vômito, e realização de exame morfológico que identificou o parasita como *S. erinaceieuropaei* (GASTON e PABLO, 2021), assim como dois gatos na Coreia, que além de liberarem proglótides pelo vômito, tiveram ovos identificados nas fezes (KIM et al., 2021). Outro gato, no Nordeste do Brasil, foi diagnosticado com *S. mansonioides* a partir de proglótides expelidas nas fezes (LIMA et al., 2020). Análises de dois genes mitocondriais, *cox1* e *nad1*, juntamente com análise morfológica das proglótides em coloração Carmim, serviram para identificação de *S. ranarum* expelidas nas fezes de um leão (EOM et al., 2018) e de *S. theileri* nas fezes de um leopardo (*Panthera pardus*) e uma hiena (*Crocuta crocuta*) (EOM et al., 2019), na Tanzânia. Outro estudo na Tanzânia examinou 15 amostras de fezes contendo os parasitos, realizando exames morfológicos e moleculares com sequenciamento de DNA mitocondrial do gene *cox1* e ITS1, determinou a ocorrência de *S. ranarum* em um leopardo, *S. erinaceieuropaei* em outro leopardo e *S. theileri* em uma hiena (*Crocuta crocuta*), seis leões (*Panthera leo*) e seis leopardos (*Panthera pardus*) (NDOSI et al., 2020).

Muitos casos só são identificados durante a necropsia, quando em seguida são realizadas análises morfológica e/ou molecular do parasita, como no caso de um felino de rua no Chile, que apresentava claudicação que evoluiu para paralisia, foi eutanasiado e necropsiado, revelando a presença do parasita no intestino, identificado como *S. decipiens* complex 1, através de exames morfológicos da proglótide corada por Carmim e corte histológico corado com H&E, e análise molecular pelo gene *cox1* (FREDES et al., 2021). Na Nova Zelândia, os parasitos recuperados do intestino delgado de um felino foram identificados como *S. erinacei*/*S. erinaceieuropaei* por meio de análise molecular do gene *cox1* (UGARTE et al., 2005).

Em um trabalho recente, YAMASAKI et al. (2024), realizaram o sequenciamento completo do gene *cox1* de *Spirometra* adultos obtidos de oito

gatos, um cão e duas raposas em diferentes localidades no Japão, e identificaram *S. mansoni*.

Alguns raros casos humanos foram examinados morfológica e molecularmente. Um paciente que ao expelir, após tratamento com Praziquantel, partes do estróbilo, foi diagnosticado como portador de *S. erinaceieuropaei* por meio de exame molecular do gene *cox1* (LE et al., 2017). Em dois casos humanos na Coreia, previamente identificados como *Dibothriocephalus latus*, foram posteriormente reexaminados e confirmados como de *S. erinacei* (= *S. erinaceieuropaei*), por exames morfológicos por montagens coradas por Carmim e cortes longitudinais corados por H&E (LEE et al., 1984).

2.4.5 Tratamento de espirometrose

O tratamento com Praziquantel (7,5mg/kg) em duas doses, mostrou-se eficaz em felinos (FERRAZ et al., 2020). Em outro trabalho, foram administradas duas doses, com intervalo de 15 dias, de 0,5ml de um composto de Pyrantel (144mg), Praziquantel (50mg) e Febendazole (200mg) em felinos (LIMA et al., 2020). Dois felinos tratados por KIM et al. (2021) receberam tratamento com Praziquantel, sendo que o primeiro, 35mg/kg em duas doses com intervalo de 15 dias e o segundo, 12,5mg por quatro dias consecutivos.

Em cães, a administração de três doses em dias consecutivos de 5mg/kg de Praziquantel foi eficaz para eliminação de *Spirometra* adulto (SAHOO et al., 2018).

Em um dos raros casos humanos já relatados, o tratamento consistiu em dose única total de 1200mg de Praziquantel (LE et al., 2017). Outro paciente humano foi tratado com Praziquantel na dosagem de 25mg/kg, três vezes ao dia, por três dias consecutivos (WANG et al., 2012).

O tratamento realizado com vermífugo à base de Pirantel e Niclosamida em um gato na Nova Zelândia não foi eficaz (UGARTE et al., 2005).

2.5 Caracterização por Biologia Molecular

A classificação taxonômica das espécies que compõem o gênero *Spirometra* tem sido controversa e permanece uma das mais complicadas entre

os cestodas principalmente no que tange especificidade de hospedeiros e distribuição geográfica (SCHOLZ et al., 2019; YAMASAKI et al., 2021).

Diversos autores citam não ser possível identificar as espécies de *Spirometra* com base apenas em caracteres morfológicos (SCHOLZ et al., 2019, YAMASAKI et al., 2021), considerando a existência de aproximadamente 50 espécies de *Spirometra* descritas dessa forma, sendo que a maioria dessas espécies não foram adequadamente caracterizadas (SCHOLZ et al., 2019), além do emprego de diferentes e confusas nomenclaturas (YAMASAKI et al., 2023).

O gênero já foi revisado e reclassificado algumas vezes, (KAMO, 1999; KUCHTA & SCHOLZ, 2017) sendo que na última revisão, seis espécies foram consideradas válidas e geograficamente bem definidas, em que a origem geográfica tem papel importante na distinção específica. Essas espécies são *S. erinaceieuropaei* na Europa, *S. folium* na África, *S. mansonii* com maioria das ocorrências na Ásia, porém ocorrendo também na África, Austrália e América do Sul. Na Ásia também foi documentada a espécie não identificada *Spirometra* sp. 1, recentemente classificada como *S. asiana* por YAMASAKI et al. (2024) e por fim, nas Américas, a *S. decipiens* complex 1 e 2 (KUCHTA et al., 2020), classificadas também como *Spirometra* sp. 2 e *Spirometra* sp. 3, por KUCHTA et al. (2024) como pode ser observada no Quadro 1:

Quadro 1: Espécies válidas do gênero *Spirometra*. Análise com base em análises filogenéticas do gene mitocondrial *cox 1*, e em estudos mais recentes (BRABEC et al., 2022; KUCHTA et al., 2022; YAMASAKI et al., 2024; KUCHTA et al., 2024).

Europa	<i>S. erinaceieuropaei</i> (maioria dos casos) <i>S. mansonii</i>
Ásia	<i>S. mansonii</i> (maioria dos casos) <i>S. asiana</i> (descrita no Japão e Coreia do Sul)
África	<i>S. folium</i> (syn <i>S. theileri</i>) <i>S. mansonii</i> (apenas uma sequência, na Tanzânia)
Oceania	<i>S. mansonii</i>
Américas	<i>S. decipiens</i> complex 1 (<i>Spirometra</i> sp. 2) <i>S. decipiens</i> complex 2 (<i>Spirometra</i> sp. 3) <i>S. mansonii</i> (apenas uma sequência, na Colômbia)

Esses estudos moleculares recentes revelaram que a maioria dos casos atribuídos à *S. erinaceieuropaei*, *S. decipiens* e *S. ranarum* descritos na Ásia tratar-se-iam de *S. mansoni* (KUCHTA et al., 2020; YAMASAKI et al., 2021), além de enfatizarem que na Ásia, *S. mansoni* e *S. asiana* são agentes causadores de esparganose e espirometrose (YAMASAKI et al., 2024).

Segundo KUCHTA & SCHOLZ (2017), a problemática na taxonomia surgiu devido ao fato de alguns autores não considerarem a possibilidade de variações morfológicas induzidas pelo hospedeiro, associadas ao porte, idade e origem geográfica, e nesse sentido, o uso do sequenciamento molecular para confirmar ou revisar delimitações de espécies se torna um método promissor para auxiliar a superar esse problema. Tem sido classificado como o único método confiável para a identificação dos difilobotrídeos, e obrigatória a conservação de amostras em etanol para análises moleculares (WAESCHENBACH et al., 2017; KUCHTA & SCHOLZ, 2017).

Considerando que a taxonomia das espécies de *Spirometra* tem sido objeto de discussões pelas suas inconsistências, KUCHTA et al. (2024) recomendam que os novos nomes específicos sejam empregados de acordo com aqueles já estabelecidos, segundo os hospedeiros e localização geográfica.

Os genes mitocondriais demonstram ser os mais adequados para estudos sistemáticos e diagnósticos em amostras clínicas. O gene *cox1* é o mais utilizado e permite diferenciação entre espécies congêneres de difilobotrídeos. Por outro lado, marcadores nucleares como 18S rDNA e 28S rDNA, não são suficientes para diferenciar inequivocamente espécies congêneres (KUCHTA et al., 2015), e embora alguns trabalhos tenham realizado análises utilizando o 28S rDNA (ZHANG et al., 2014). Os marcadores empregados amplificam uma região muito curta, com aproximadamente 300 pares de base (PB) que não contém informações suficientes para análises filogenéticas (ZHANG et al., 2017).

O sequenciamento completo do genoma mitocondrial contribuiu significativamente para as análises filogenéticas, permitindo assim uma resolução mais precisa das relações taxonômicas (ZHANG et al., 2017). LIU et al. (2012) realizaram o sequenciamento completo do genoma mitocondrial de *S. erinaceieuropaei* de um espécime adulto coletado em um cão na China. O mesmo sequenciamento havia sido feito em um plerocercóide coletado em uma serpente no Japão (dados não publicados, apenas registrados no GenBank

NC_011037). Ambos os sequenciamentos da China e do Japão continham 12 Genes Codificadores de Proteínas (PCGs) (*cox1*, *cox2* e *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad5* e *nad6*, *nad4L*, *atp6* e *cytb*), 22 genes RNA transportador, dois genes de RNA ribossomais, e duas regiões não codificantes, do mesmo modo que em diversos outros estudos com *Spirometra* e difilobotrídeos (LIU et al., 2012; EOM et al., 2015; ZHANG et al., 2017). O isolado chinês apresentou 13.641 pares de base, e o japonês 2 a menos (13.639), que o autor atribuiu à diferença de hospedeiro, estágio de desenvolvimento do parasita, ou localização geográfica (LIU et al., 2012). EOM et al. (2015) também realizaram sequenciamento completo de genoma mitocondrial de adultos de *S. eurinaceieuropaei* coletado na forma de plerocercóide em uma mulher e *S. decipiens* coletado de uma serpente que foram infectados experimentalmente em um cão e um gato, e obtiveram 13.643 pares de base e 13.641 pares de base, respectivamente.

O genoma mitocondrial de *S. eurinaceieuropaei* apresentou grande quantidade de timina (T) e baixa concentração de citosina (C) (T 45,9%, A 20,4%, G 22,6% e C 11,1%) como em outras espécies de pseudofilídeos (LIU et al., 2012). Genomas mitocondriais com quantidades altas de A e T são menos estáveis, e essa característica nos difilobotrídeos beneficia mutações genéticas na mitocôndria, podendo assim influenciar o processo evolutivo para esses parasitos (ZHANG et al., 2017).

Os genes mitocondriais mais longos de *S. eurinaceieuropaei* são o *cox1* e o *nad5* com cerca de 1566 pares de base cada (LIU et al., 2012). O mesmo estudo concluiu que o *cytb* e *nad4* fornecem uma alternativa para novos marcadores para estudos genéticos para populações de *S. eurinaceieuropaei* de diferentes hospedeiros e diferentes localizações geográficas. ZHANG et al. (2017) concluíram que o gene *cox2* é um codificador mais conservado e que *cox1*, *cytb* e *nad4* apresentam alta variabilidade em suas sequências, indicando que são os mais adequados para serem utilizados como marcadores genéticos para estudos de populações de *S. eurinaceieuropaei* de diferentes hospedeiros e regiões geográficas.

Embora o sequenciamento completo do genoma mitocondrial contribua com a identificação das espécies, sua viabilidade é questionável na rotina, visto que apresenta alto custo e grande empenho para obtenção e análise desses

dados, comparado ao “padrão ouro” para genotipagem de amostras de *Spirometra*, que é o sequenciamento do gene *cox1* (KUCHTA et al., 2024).

O DNA barcoding, é amplamente utilizado como marcador genético em estudos de diversidade genética de diferentes grupos taxonômicos, sendo que sua aplicação primária consiste em detecção e identificação de novas espécies (SOLOVYEVA et al., 2023).

O gene mitocondrial *cox1* é o mais utilizado em pesquisas para identificação molecular de espécies de *Spirometra*, como pode ser observado seu emprego em dezenas de artigos (UGARTE et al., 2005; BERGER et al., 2009; BAUCHET et al., 2013; BOONYASIRI et al., 2014; JONGTHAWIN et al., 2014; JEON et al., 2015; PETRIGH et al., 2015; JEON et al., 2016a; SOBOCINSKA et al., 2016; BADRI et al., 2017; KUDO et al., 2017; LE et al., 2017; EOM et al., 2018; JEON et al., 2018a; NDOSI et al., 2020; YUDHANA et al., 2020; FREDES et al., 2021; KIM et al., 2021; NATH et al., 2021; VEROCAI et al., 2023)

2.6 Métodos de delimitação de espécies

De acordo com vários autores, espécies são uma das unidades fundamentais da biologia, tendo como comparação em importância, a genes, células e organismos, como algumas das unidades fundamentais em níveis inferiores da organização biológica, entretanto, espécies existem em um nível de organização superior do que os humanos podem observar, fazendo com que seja quase impossível para os homens distinguirem espécies simplesmente visualizando-as, como fazem com células e organismos, e devido a isso, surgiu o tópico de delimitação de espécies (DE QUEIROZ, 2007). Definir uma divisão entre diferenças intraespecíficas e interespecíficas é o objetivo principal dos métodos de delimitação de espécies, utilizando conjunto de dados de um marcador único (LEAVITT et al., 2015).

Especiação pode ser conceitualizada em alguns processos evolucionários como mutação, seleção natural, migração e fluxo genético. Os caracteres impactados por esses processos são altamente divergentes. Eles podem ser genotípicos ou fenotípicos, qualitativos ou quantitativos, vantajosos ou não, além de envolverem diferentes aspectos na biologia do organismo, incluindo genética, desenvolvimento, morfologia, fisiologia e comportamento. Esses processos

passam através de estágios de polifilia, parafilia e monofilia, e não acontecem ao mesmo tempo e nem seguem alguma ordem (DE QUEIROZ, 2007).

Um ponto central para identificar caracteres para estabelecimento de limites taxonômicos baseados em fenótipos é entender as diferenças entre variação morfológica dentro das espécies e entre grupos relacionados. Uma vez que a utilização convencional de critérios fenotípicos pode ser problemática, dados moleculares são valiosos para delimitação de espécies, e particularmente quando analisados sob rigoroso método estatístico, independentemente de diferenças fenotípicas em caracteres aparentes para observações humanas (LEAVITT et al., 2015).

Métodos empíricos de delimitação de espécies normalmente usam como base a detecção de espécies presumíveis; atribuição de amostra individual para um grupo de espécie ou Unidade Taxonômica Operacional (OTU); validação da espécie candidata ou OTU como uma linhagem distinta, e dedução de relacionamento de espécies (LEAVITT et al., 2015).

Idealmente, critérios para delimitação de espécies deveriam ser baseados em métodos estatísticos com o objetivo de avaliar os limites entre espécies e minimizar a necessidade de interpretações subjetivas e perícia taxonômica (LEAVITT et al., 2015).

A precisão de métodos de delimitação de espécies utilizando um único *locus* depende da história evolutiva do grupo estudado, e sua variabilidade genética. A delimitação de espécie será mais difícil em linhagens que divergiram mais recentemente, ou em casos com algum nível de fluxo genético interespecífico relativo à linhagens mais antigas e divergentes. A utilização de *locus* único deve ser feita para obtenção de dados preliminares de delimitação de espécies (LEAVITT et al., 2015).

A utilização de DNA *barcode* é uma ferramenta de identificação e caracterização de genes para grupos inexplorados, e nesse caso, os resultados obtidos com DNA *barcode* não podem ser comparados diretamente com outras informações independentes. Ao invés disso, grupos revelados por *barcodes* são aplicados como primeiro conjunto de hipóteses para uma espécie, sendo o ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) desenvolvido para esse propósito (PUILLANDRE et al., 2012).

O ABGD é um método rápido e simples, que pode ser utilizado para grupos de indivíduos representados em uma sequência de *locus* único que pode ser complementada com outras evidências numa abordagem de taxonomia integrativa. Trata-se de um procedimento que classifica sequências de espécies hipotéticas, baseado na existência de *barcodes* observadas a qualquer momento em que as distâncias intraespecíficas forem menores do que aquelas entre as diferentes espécies, ou seja, ele encontra a distância onde o *barcode* está localizado (PUILLANDRE et al., 2012).

Os objetivos desse método (ABGD) são: 1) deduzir estatisticamente e automaticamente os *barcodes* e deduzir a distribuição das informações corretamente, 2) metodicamente aplicar o procedimento a novos grupos de sequências de espécies candidatas (PUILLANDRE et al., 2012).

Uma vez que os *barcodes* são detectados, as informações são distribuídas em grupos de espécies candidatas. Os grupos são escolhidos, e as distâncias entre as sequências dos diferentes grupos é sempre maior que a distância do *barcode*, e para cada sequência de cada grupo, há uma distância menor que a distância do *barcode*, fazendo assim a divisão primária. Em seguida, o método é reaplicado para cada grupo da divisão primária, e assim sucessivamente até que não sejam formadas mais divisões (PUILLANDRE et al., 2012).

Uma espécie é considerada delimitada quando todos os membros pertencerem ao mesmo grupo e nenhuma sequência mais se encaixar nele. O ABGD também detecta diferenças entre divergências intraespecíficas e interespecíficas (PUILLANDRE et al., 2012).

No crescente campo da delimitação de espécies, muitos métodos apelam para conceito de espécies filogenéticas, identificando unidades filogenéticas mínimas como as OTU, que inclui o PTP (Poisson tree processes). O PTP requer uma árvore filogenética contendo no comprimento das ramificações a quantidade de mutações, ao invés de tempo. O PTP assume que determinada árvore filogenética reflete com precisão a diversificação das espécies (ZHANG et al., 2013). O comprimento da árvore e das ramificações são inferidas a partir de um alinhamento de sequência utilizando máxima verossimilhança (RANNALA & YANG, 2020).

O método PTP (Poisson Tree Processes) identifica os pontos de transição intra e inter-específicos nas ramificações. Seu princípio baseia-se no número de

substituições entre espécies ser significativamente superior ao número de substituições dentro de uma espécie, sendo que qualquer substituição individual tem baixa probabilidade de gerar uma especiação (ZHANG et al., 2013). A expectativa do número significativo de substituições até eventos de especiação, e até eventos de coalescência é de seguirem distribuições exponenciais (distribuição de Poisson), formando dois processos diferentes na árvore (ZHANG et al., 2013; LUO et al., 2018). O método molda os comprimentos das ramificações, em uma árvore não ultramétrica enraizada, em duas classes de distribuição exponencial: uma descreve o número médio de substituições até a próxima especiação e o outro descreve eventos de coalescência intraespecíficos, atribuindo cada ramificação em uma dessas duas classes (ZHANG et al., 2013; RANNALA & YANG, 2020).

Uma das vantagens desse método é que sua abordagem pode manipular grande quantidade de dados contendo centenas de espécies (RANNALA & YANG, 2020), além de fornecer um caminho direto e objetivo para delimitação das supostas linhagens em nível de espécie (LEAVITT et al., 2015). Ele é adequado para identificação de espécies que foram separadas por longos intervalos antes da especiação e que possuem populações pequenas (RANNALA & YANG, 2020). É um método simples, rápido e robusto, exigindo apenas uma árvore filogenética padrão (ZHANG et al., 2013).

As delimitações entregues pelo PTP são de supostas espécies, sendo necessário integrar dados adicionais para validar as delimitações, como informações morfológicas, e sequenciamento de mais genes, num contexto de taxonomia integrativa. Para estimativas mais precisas, é necessário que a árvore esteja corretamente enraizada (ZHANG et al., 2013).

Já o método GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent) foi desenhado para delimitar espécies que evoluíram independentes, utilizando um único locus e uma árvore ultramétrica. Por “evolução independente”, entende-se que novas mutações que surgem em uma espécie não se desenvolvem prontamente em outra espécie. Seu emprego utiliza uma mistura do processo de ramificação de Yule com um modelo coalescente. Esse método prevê que evoluções independentes levam ao aparecimento de um agrupamento genético distinto, separados por longas ramificações internas, delimitando esses agrupamentos através da otimização do conjunto de nós que definem a transição inter e intra-

específicas. A otimização se resulta em encontrar a probabilidade máxima (maximum likelihood - ML) para um modelo que combine diversificação entre espécies e ramificações dentro das espécies. O GMYC não depende de evidências adicionais para formular uma hipótese de espécie candidata, portanto pode ser aplicado em casos de escassez de dados (FUJISAWA & BARRACLOUGH, 2013; LEAVITT et al., 2015; RANALLA, 2015; LUO et al., 2018).

Esse modelo estatístico foi desenvolvido para testar as mudanças esperadas nas taxas de ramificações em delimitação de espécies, sendo o principal objetivo do método, classificar o intervalo de ramificações definidos pelos nós, resultando em processo de diversificação (inter-específico) ou coalescência (intraespecífico) (PONS et al., 2006).

A operação do GMYC se baseia em método de probabilidade, através da análise do tempo dos eventos de ramificação nas árvores filogenéticas, formulando a distribuição do intervalo de tempo entre os eventos de ramificações (PONS et al., 2006). Assume-se uma constante taxa de ramificações, tanto no processo de populações e de diversificações, que aparentemente são improváveis de se manterem estacionários (FUJISAWA & BARRACLOUGH, 2013).

A abordagem do GMYC atribui os eventos de ramificações em duas categorias: especiação e coalescência dentro da espécie, assumindo que espécies são monofiléticas, pode-se especificar um conjunto de nós ancestrais comuns mais recentes (MRCA), que determinam o tipo de evento de ramificação. Ramos que descendem dos nós do MRCA significam eventos de coalescência dentro de uma espécie, e clados definidos por cada nó do MRCA, são conjuntos de espécies, e o conjunto de MRCAs com a máxima probabilidade é selecionada como o melhor modelo de delimitação (PONS et al., 2006)

Um dos desafios é que mesmo que se assuma a monofilia em uma árvore pequena, existe um número enorme de possibilidades de modelos de delimitação (FUJISAWA & BARRACLOUGH, 2013), e na abordagem proposta por PONS et al. (2006) é que exista um limiar de tempo, antes de que os nós reflitam eventos de diversificação, e depois que todos os nós reflitam eventos coalescentes, reduzindo o número de candidatos para o mesmo número de nós na árvore.

O GMYC funciona melhor em populações pequenas e com baixas taxas de nascimento, e um dos entraves é a dependência da precisão da árvore ultramétrica (ZHANG et al., 2013).

Estudos empíricos revelaram que o ABGD e o GMYC tendem a sub e super dividir as espécies, respectivamente. O PTP tende a superar o GMYC quando as distâncias interespecíficas são pequenas. Estes dois métodos presumem que as árvores filogenéticas refletem com precisão a diversificação das espécies (LUO et al., 2018).

O método ASAP (Asemble Species by Automatic Partitioning) consiste em um algoritmo de agrupamento ascendente hierarquicamente, que mescla as sequências dentro de grupos que são sucessivamente mesclados até que todas as sequências formem um grupo único. A cada etapa de fusão, a atribuição de todas as sequências em grupos, são chamadas de “partições”. A primeira partição contém tantos grupos quanto sequências, enquanto que a última partição é um único grupo com todas as sequências dentro. Grupos maiores são criados pela fusão de grupos das partições anteriores juntas. Toda nova partição é caracterizada de duas maneiras: a primeira, que quantifica a chance de cada novo grupo ser uma nova espécie, e a segunda, onde é computada a distância de intervalo de cada *barcode* entre a partição anterior e a nova. Ambas as métricas (probabilidade e distância de intervalo de *barcode*) são combinadas dentro de um escore que é utilizado para classificar as partições (PUILLANDRE et al., 2021).

Nesse modelo, cada distância é considerada apenas uma vez e em ordem crescente para a finalidade de agrupamento, sendo que distâncias iguais são tratadas juntas e agrupadas no mesmo grupo. Consequentemente, quando as sequências que estão em grupos distintos são agrupadas juntas, o grupo anterior é mesclado dentro de um novo grande grupo, e associado à atual distância de agrupamento. Quando uma nova partição é formada o processo de agrupamento cessa e é finalizado. O ASAP continua com o agrupamento, procurando pela próxima distância até outra partição ser construída. O algoritmo para quando todas as sequências são mescladas dentro de um único grupo final (PUILLANDRE et al., 2021).

Uma vez que uma nova partição é formada, o ASAP testa cada uma se o valor p é inferior a um dado risco e consequentemente deva ser dividido. Quando ocorre uma divisão, o método ASAP recursivamente avalia todos os subgrupos,

se devem ser divididos também. O ASAP também calcula se a distância do *barcode* está associada com a partição atual (PUILLANDRE et al., 2021).

No fim do agrupamento, o ASAP pontua e classifica todas as partições utilizando dois critérios: o valor p classificado por ordem crescente (o menor valor p é classificado em primeiro) e sua classificação de distância de espaço de *barcode*, em ordem decrescente (a maior distância é classificada em primeiro). A classificação do ASAP é a média de ambos os rankings: quanto menor, melhor (PUILLANDRE et al., 2021).

Uma de suas principais qualidades é ser extremamente rápido, quando comparado a qualquer método que depende de construção de árvore. Além disso, não requer nenhum conhecimento prévio como o número de espécies, composição da espécie, ou qualquer informação biológica, como a árvore filogenética ou distâncias genéticas interespecíficas. Apenas distâncias genéticas pareadas são utilizadas para construir uma lista de partições classificadas por pontuações. Em comparação, a performance do ABGD e do ASAP é similar, o PTP performa muito bem, e o GMYC performa muito bem desde que trabalhe com um número não muito grande de espécies (PUILLANDRE et al., 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Identificação morfológica e molecular dos espécimes de plerocercóides de *Spirometra* sp. recuperadas em anfíbios e répteis na região do Pantanal, empregando a indução de infecção em cães e gatos para a obtenção de formas adultas do cestoda.

3.2 Específicos:

Identificar as espécies de anfíbios e répteis portadores de plerocercóides de *Spirometra* sp. na região da Nhecolândia, Pantanal, MS;

Induzir infecção experimental em cães e gatos domésticos com plerocercoides para caracterização morfológica, molecular e biológica das formas adultas de *Spirometra* spp. recuperadas após a indução da infecção.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostragem de anfíbios e répteis

As capturas de répteis e anfíbios ocorreram na sub-região da Nhecolândia no Pantanal, que é a de maior extensão, entre todas as sub-regiões pantaneiras, e está limitada ao norte pelo rio Taquari, um dos maiores rios no Pantanal, e a leste pelo rio Negro e diversas vazantes. A Nhecolândia compreende habitats entremeados com áreas abertas e fechadas, matas ripárias, capões e cordilheiras, entre salinas, baías, vazantes e rios. O campo inundável, com vegetação nativa e também exótica, áreas com presença de capim caronal (*Elyonurus muticus*) (POTT, 1988), Cerrado e Cerradão (SILVA et al., 2000) são as fitofisionomias encontradas nessa sub-região. O período de maior precipitação nessa sub-região está compreendido entre os meses de outubro a março (SORIANO e GALDINO, 2002), com seu regime de inundação influenciado pelos rios Taquari e Negro.

As amostragens com finalidade de indução de infecção experimental foram realizadas, em março de 2021, compreendendo esforço amostral mínimo de cinco noites por expedição. Os animais foram capturados através de busca ativa e também com emprego de vinte armadilhas de interceptação e queda (*pitfall*). As armadilhas foram constituídas por dois recipientes plásticos (verde ou azul escuro), com volume de 108 litros (diâmetro de 52 cm de abertura e 65 cm de profundidade) e tela de interceptação, com cerca de 15-20m de comprimento. As armadilhas foram vistoriadas diariamente, numa área de 25Km², e distanciadas entre 1 e 5km entre elas.

Os espécimes capturados foram acondicionados em caixas térmicas para evitar a desidratação e superaquecimento, sendo mantidos sob refrigeração e transportados para o laboratório de Parasitologia Animal, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, onde foram realizados os procedimentos laboratoriais parasitológicos. Outros animais

eventualmente capturados, como pequenos mamíferos, aranhas, foram soltos imediatamente.

Cada animal capturado foi medido, pesado, fotografado e identificado. Os animais foram eutanasiados conforme resolução 1000/2012 CFMV e necropsiados, seguindo os procedimentos usuais em estudos anatomopatológicos e para a coleta de parasitos. Todas as amostras contendo plerocercoides foram identificadas segundo a numeração de identificação do animal em que foi coletada.

Espécimes parasitos, que não os agentes alvos do presente estudo, foram armazenados e mantidos para estudos futuros.

Os espécimes de plerocercoides encontrados em cada animal foram cuidadosamente retirados, e quantificados, sendo em seguida colocados em beakers contendo água Milli Q e identificados pela numeração de seu hospedeiro, até o momento da preparação para a inoculação nos cães e gatos.

4.2. Animais experimentais

Foram selecionados quatro cães, raça indefinida (SRD), adultos, clinicamente saudáveis, sendo identificados como C1, C2, C3 e C4, e três gatos, adultos, SRD, saudáveis e identificados como G1, G2 e G3; as características individuais estão contidas no quadro 2:

Quadro 2: Identificação dos animais utilizados na reprodução experimental da infecção com plerocercoides de *Spirometra* sp..

Identificação	Hospedeiro	Sexo	Idade	Peso em kg
C1	Canino	Macho	Adulto	10
C2	Canino	Fêmea	Adulto	19
C3	Canino	Macho	Adulto	15
C4	Canino	Macho	Adulto	8
G1	Felino	Macho	Adulto	4
G2	Felino	Macho	Adulto	3
G3	Felino	Fêmea	Adulto	3

Todos os animais foram previamente avaliados clinicamente, classificados com bom escore corporal e sem alterações clínicas. Foram realizados exames clínicos, hematológicos e parasitológicos que asseguraram a higidez dos animais. Todos foram medicados quinze dias antes da inoculação experimental com formulações a base de benzimidazóis e praziquantel (BASKEN Plus®, KONNIG do Brasil®), com dosagem recomendada pelo fabricante, e, nos dias subsequentes, as fezes examinadas para a presença de ovos de helmintos, a fim de que iniciassem o experimento totalmente everminados.

Os cães foram mantidos em canis individuais, e os gatos em gatis individuais, ambos abrigados das intempéries naturais, com água e alimentação adequada e *ad libitum*, além dos ambientes dotados de enriquecimento ambiental, e submetidos a passeios diários. O ambiente e utensílios foram limpos e higienizados diariamente, quantas vezes foram necessárias.

Considerando que o objetivo do trabalho não foi descrever aspectos fisiopatológicos da parasitose, mas tão somente a obtenção de formas adultas para a precisa identificação morfológica e molecular, os animais foram submetidos apenas a exames clínicos rotineiros diários para simples controle do estado geral. As fezes foram coletadas diariamente e as amostras processadas pelas técnicas de sedimentação (LUTZ, 1919; HOFFMAN, PONS & JANER, 1934) e Centrífugo-Flutuação em solução saturada de açúcar modificada (SHEATHER, 1923), com finalidade de detectar a presença de ovos dos agentes inoculados.

4.3 Inoculação experimental

Os plerocercoides recuperados dos hospedeiros paratênicos foram administradas por via oral para cada animal experimental, sendo previamente quantificados e inseridos no interior de salsichas (tipo hot-dog tradicional Sadia®), para os cães, e em peixes lambaris (*Astyanax lacustris*) frescos para os gatos. O Cão 1 (C1), Cão 3 (C3) e o Gato 1 (G1) receberam plerocercoides recuperados de cobras Jararaca (*Bothrops mattogrossensis*), nas quantidades de 31, 33 e 27 plerocercoides, respectivamente. O Cão 2 (C2), Cão 4 (C4) e Gato 2 (G2) receberam plerocercoides recuperados de cobras Coral (*Micrurus frontalis*) nas quantidades de 25, 10 e 25 plerocercoides, respectivamente. O Gato 3 (G3)

1481 recebeu 25 plerocercoides de Serpente olho de gato (*Leptodeira pulchriceps*) e
 1482 muçurana (*Mussurana bicolor*) conforme consta no quadro 3:

1483

1484 **Quadro 3:** Quantidade de plerocercoides inoculados em cada animal experimental e respectivas
 1485 espécies dos hospedeiros nos quais foram recuperados.

Animal experimental	Número de plerocercoides inoculados	Hospedeiro fonte do plerocercóide inoculado
C1	31	Jararaca (<i>Bothrops matogrossensis</i>)
C2	25	Coral (<i>Micrurus frontalis</i>)
C3	33	Jararaca (<i>Bothrops matogrossensis</i>)
C4	10	Coral (<i>Micrurus frontalis</i>)
G1	27	Jararaca (<i>Bothrops matogrossensis</i>)
G2	25	Coral (<i>Micrurus frontalis</i>)
G3	25	Serpente olho de gato (<i>Leptodeira pulchriceps</i>) e muçurana (<i>Mussurana bicolor</i>)

1486 C = Cão G= Gato

1487

1488 4.4 Necropsias

1489

1490 Após constatada a presença de ovos característicos nas fezes, os animais
 1491 foram eutanasiados. O procedimento de eutanásia foi realizado conforme
 1492 Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

1493 Os animais foram necropsiados adotando procedimentos usuais em
 1494 anatomia patológica. As formas parasitárias adultas encontradas no intestino
 1495 delgado foram recuperadas, lavadas em solução salina (0,85%), mantidos em
 1496 geladeira até completa paralisação, e fixados em álcool etílico 70°.

1497

1498 4.5 Processos de identificação morfológica dos cestodas

1499

Porções anteriores, mediais e distais dos estróbilos dos espécimes de cestodas recuperados, foram coradas com carmim clorídrico pelo método regressivo e com hematoxilina e eosina (AMATO & AMATO, 2010).

Também foram realizados cortes histológicos longitudinais e transversais, em proglótides imaturas e grávidas, em áreas correspondentes às mesmas porções proximal, média e distal do estróbilo. O material foi processado, por técnica usual em histologia, cortado na espessura de 15µm em micrótomo Leica RM2245® e corados com hematoxilina e eosina.

As preparações dos espécimes, foram montadas em lâminas e examinadas e documentadas em Microscópio Leica DM5500 B® e Estereomicroscópio Leica M205 A®, ambos equipados com câmeras Leica DFC 490® (Leica Microsystems™, Wetzlar and Mannheim, Germany) e sistema de análises de imagens Leica Application Suite – LAS® 3.8 (Leica Microsystems™, Wetzlar and Mannheim, Germany).

Para as preparações para exame em microscopia eletrônica de varredura, os espécimes foram desidratados em série crescente de álcool etílico (70°; 80°; 95° e 100°), em seguida imersos em Hexametildisilazano (Cat. Number 440191 Sigma-Aldrich™) por 10 minutos e posicionados em stubs 12.7 x 12.7mm (Ted Pella®, Inc., USA) sobre fita de carbono (Carbon Conductive Tabs 12mm OD, PELCO Tabs™ - Ted Pella®, Inc., USA); em seguida examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura Hitachi® Modelo TM3000™ (Hitachi, Tokyo, Japan) no modo analy.

Os espécimes adultos foram analisados segundo caracteres taxonômicos sumarizados no quadro 3, no anexo.

4.6 Procedimentos genéticos

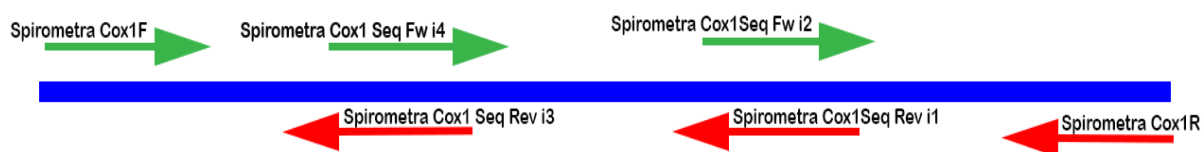
O DNA genômico foi extraído de dois esparganos de *Spirometra* sp., assim recuperados, de uma *Bothrops matogrossensis* (Jararaca) (Br3) e de um *Salvator merianae* (Teiú) (Br5); os parasitos foram lavados em água Milli Q, e preservados em álcool 70°. Antes do processo de extração do DNA, os parasitos foram lavados novamente em água Milli Q, e submetidos à técnica de extração de DNA pelo Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), a saber: a amostra foi digerida em 600 µL de solução de SNET contendo Proteinase K, na concentração de 400 µg/mL, mantidos por 12 horas em estufa a 56 °C em sistema

de *roller* em posição horizontal. Após esse período foi adicionado volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, mantidos em agitação no sistema *roller* por 30 minutos em temperatura ambiente. A separação das fases orgânica e aquosa por centrifugação, a 1000g por 5 minutos em temperatura ambiente, sendo a fase aquosa superior transferida para microtubo e adicionada de igual volume de isopropanol gelado ($\pm 10^{\circ}\text{C}$). Ato seguinte, após suave homogeneização, foi centrifugado 15000g por 15 minutos a 4°C , o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol a 70°C gelado ($\pm 10^{\circ}\text{C}$), novamente centrifugados nas mesmas velocidades anterior e o líquido desprezado. O *pellet* foi seco ao ar em temperatura ambiente, e em seguida dissolvido em solução de TE (pH 8,0)

Após finalizado o processo, a amostra de DNA extraída foi avaliada usando equipamento Nanodrop para determinar concentração e nível de pureza do DNA. Amplificações de DNA mitocondrial, por reações em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada na Niigata University of Pharmacy and Medical and Life Sciences, com objetivo de amplificação completa do gene da citocromo c oxidase (COI sub-unidade I – *cox1*), usando os primers: *Spirometra* Cox1F – TATCAA ATT AAG TTA AGT AGA CTA; e *Spirometra* Cox1R – CCA ATT AGC ATG ATG CAA AAG. As amplificações por PCR foram realizadas usando o mixTaKaRa EX Premier™ (Takara Bio Inc. Japão) seguindo o protocolo do fabricante, com um volume final de 50 μL . O perfil de ciclagem térmica programado em um termociclador Eppendorf Mastercycler Ep System (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), etapa de desnaturação inicial a 94°C (2 min); 35 ciclos de 94°C (30''), 58°C (30'') e 68°C (90''); seguido por uma extensão final a 72°C (7 min); e mantidos a 4°C . Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, usando coloração em gel de ácido nucleico GelRed (Biotium, CA, EUA) e visualizados sob um transiluminador UV. As amostras amplificadas foram purificadas usando o kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen Ltd., Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante.

Para as reações de sequenciamento, além dos Primer's *Spirometra* Cox1F e *Spirometra* Cox1R, foram delineados outros quatro set de primers internos: *Spirometra* Cox1Seq Rev i1 - GAA CTA TAA AAG AAA GCA CC; *Spirometra* Cox1Seq Fw i2 – TTC TTT TAT ATC GGC GTT TA; *Spirometra* Cox1 Seq Rev i3

1567 – TTT ATA ACA ATC GGA GGA AA, e *Spirometra* Cox1 Seq Fw i4 – CGT ATT
 1568 AAA TTT GTT GAA CCT; conforme esquema abaixo (figura1):



1569
 1570

1571 **Figura 1:** Representação gráfica ilustrando a posição dos primers usados para amplificação e
 1572 sequenciamento total do gene citocromo oxidase (Cox1) delineados para o gênero *Spirometra*; os
 1573 quais permitem a amplificação de cerca de 2884 bp.

1574 O produto amplificado foi preparado para sequenciamento com Big Dye
 1575 Terminator v3.1cycle (Applied Biosystems, CA, EUA) em termociclador Gene Amp
 1576 (Applied Biosystems) e todas as sequencias obtidas foram analisadas usando um
 1577 ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). Para cada porção do gene, os
 1578 cromatogramas foram, inicialmente montados em *contigs* e editados
 1579 manualmente para ambiguidades usando o pacote de software MEGA 11
 1580 (TAMURA et al., 2021 - <https://www.megasoftware.net>). As sequências de
 1581 consenso resultantes foram comparadas quanto à similaridades com sequências
 1582 do banco de dados GenBank usando o algoritmo Basic Local Alignment Search
 1583 Tool – Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do National Centre for
 1584 Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1585 Para análises filogenéticas moleculares, foram selecionadas sequencias
 1586 completas do gene *cox1* atribuídas a *Spirometra* spp. e disponíveis no GenBank,
 1587 encontradas durante o método de Blast. As sequencias obtidas foram alinhadas
 1588 usando o programa MEGA 11, pelo algoritmo ClustalW sendo as extremidades
 1589 cortadas para que todas as sequências ficassem com o mesmo tamanho. As
 1590 reconstruções filogenéticas, foram precedidas por análise de modelo; para definir
 1591 os melhores parâmetros para construção de árvore usando métodos de máxima
 1592 verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI). Os suportes nodais nas
 1593 análises de ML foram estimados pelo teste de razão de verossimilhança
 1594 aproximada (aLRT) e por *bootstrap* não paramétrico (ML-B P) após 1000
 1595 pseudoreplicações.

1596 Para as análises de estimação das distâncias foi realizado o método
 1597 Bootstrap (FELSENSTEIN, 1985), com 1000 replicações, e modelo *p-distance*

(NEI e KUMAR, 2000) em índice uniformes. A construção da árvore para estimar a história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Hasegawa-Kishino-Yano (1985). As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de verossimilhança logarítmica superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,2399)). Esta análise envolveu 33 sequências de nucleotídeos, com um total de 1568 posições no conjunto de dados final.

Nas análises para delimitação das espécies foram empregados os seguintes programas:

- ABGD: Species delimitation by automatic barcoding gap Discovery (PUILLANDRE et al., 2012), disponível em <https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/abgd.zip> para o qual foi utilizado o arquivo fasta do alinhamento das sequências.
- ASAP: Species delimitation from single-locus sequence data by the Assemble Species by Automatic Partitioning approach (PUILLANDRE et al., 2021) disponível em <https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/asap.zip> para o qual foi utilizado o arquivo fasta do alinhamento das sequências.
- PTP: Species delimitation based on Poisson tree processes (ZHANG et al., 2013), disponível em <https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/ptp.zip>, para o qual foi empregado o arquivo tipo Newick, gerado após a construção da árvore em ML com as sequências analisadas. Utilizado no modo PTP e bPTP.
- GMYC: Species delimitation based on the Generalized Mixed Yule Coalescent (PONS et al., 2006), disponível em <https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/pyr8s.zip.zip>; para o qual foi empregado o arquivo tipo Newick, gerado após a construção da árvore em ML com as sequências analisadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatamos a ocorrência de plerocercoides de *Spirometra* na região da Nhecolândia do Pantanal Sul-Matogrossense nas serpentes das espécies *Bothrops matogrossensis*, *Erythrolamprus poecilogyrus*, *Erythrolamprus typhlus*, *Leptodeira pulchriceps*, *Leptophis ahaetulla*, *Mussurana bicolor*, *Taeniophallus occipitalis*, *Xenodon matogrossensis*, *Micrurus frontalis*, lagartos da espécie *Salvator merianae* e um anfíbio da espécie *Leptodactylus chaquensis*, sendo o primeiro registro nessas espécies. Embora décadas atrás, cobras do gênero *Bothrops* sp. e anfíbios do gênero *Leptodactylus* (*Leptodactylus ocellatus*) haviam sido registrados como portadores de esparganos, além de pequenos mamíferos e marsupiais (GOMES, 1984; FORTES e HOFFMANN, 1987; REGO & SCHAFFER, 1992; BEZERRA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2016), as informações foram limitadas, não houveram análises moleculares, tampouco reprodução experimental para obtenção do espécime adulto nesses relatos (GOMES, 1984; REGO & SCHAFFER, 1992). A ocorrência dessa espécie na região Pantaneira gera um alerta de potencial impacto em saúde pública. Os nomes das espécies, nomes vulgares, quantidade de espécimes examinados e respectivas quantidades de formas infectantes de *Spirometra*, recuperados em nosso estudo, estão listados no quadro 4:

1654 **Quadro 4:** Espécie, e número de plerocercoides recuperados em serpentes, anfíbios e répteis
 1655 capturados na Região da Nhecolândia, Pantanal, MS, Brasil no período de 2018-2021.

Espécie	Nome vulgar	Espécimes examinados/infectados	Número de plerocercoides
<i>Bothrops matogrossensis</i>	Jararaca	9/8	3 a 65
<i>Erythrolamprus poecilogyrus</i>	Cobra de capim	7/3	2 a 15
<i>Erythrolamprus typhlus</i>	Cobra verde	1/1	Vários
<i>Leptodeira pulchriceps</i>	Serpente olho de gato anelada	13/7	1 a 64
<i>Leptophis ahaetulla</i>	Azulão boia	2/1	36
<i>Mussurana bicolor</i>	Muçurana	2/2	vários
<i>Taeniophallus occiptalis</i>	Cobra-capim	1/1	vários
<i>Xenodon matogrossensis</i>	Falsa coral	2/2	5 a 6
<i>Micrurus frontalis</i>	Coral	2/2	10 a 59
<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Anfíbio	23/1	1
<i>Salvator merianae</i>	Teiú	3/2	2

1656

1657 Os plerocercoides recuperados estavam alojados no tecido subcutâneo,
 1658 inseridos na musculatura ou livres na cavidade celomática, próximos ao estômago
 1659 e até a primeira porção do intestino dos hospedeiros. Os espécimes coletados
 1660 eram achatados, mediram de 3 a 40cm de comprimento, de cor esbranquiçada
 1661 leitosa e móveis, apresentando movimentos de contração e expansão quando
 1662 imersos em água miliQ. Apresentavam escólices que se projetavam por
 1663 alongamentos e retrações rítmicas. As bótrias foram visíveis por microscopia de
 1664 luz, e também em colorações preparadas com carmim clorídrico, bem como por
 1665 microscopia eletrônica de varredura. As imagens dos plerocercoides podem ser
 1666 observadas na figura 2. Os resultados obtidos corroboram com os descritos na
 1667 literatura (CHI et al., 1980; CHERVY, 2002; KAVITHA et al., 2013; ZHANG et al.,
 1668 2014; ZHANG et al., 2015b; RUBTSOVA e HECKMANN, 2020) embora não
 1669 observamos microtríquias na superfície do escólice, como descrito por

HATSUSHIKA & OKINO (1987). SCHOLZ et al. (2019) citaram que na maioria dos casos relatados na literatura, foram determinadas espécies baseadas em observações apenas morfológicas, não tendo sido realizados exames moleculares em plerocercoides, tampouco depositados exemplares que pudessem servir para tal exame. KUCHTA & SCHOLZ (2017), relataram que é essencial a consideração de variações morfológicas induzidas pelo hospedeiro, associadas ao porte, idade e origem geográfica, e nesse sentido, o uso do sequenciamento molecular para confirmar ou revisar delimitações de espécies é obrigatório. Em nosso estudo, os plerocercoides foram submetidos a exames moleculares e inoculados em cães e gatos para obtenção do adulto e confirmação da espécie, cujos resultados serão mostrados mais a frente.

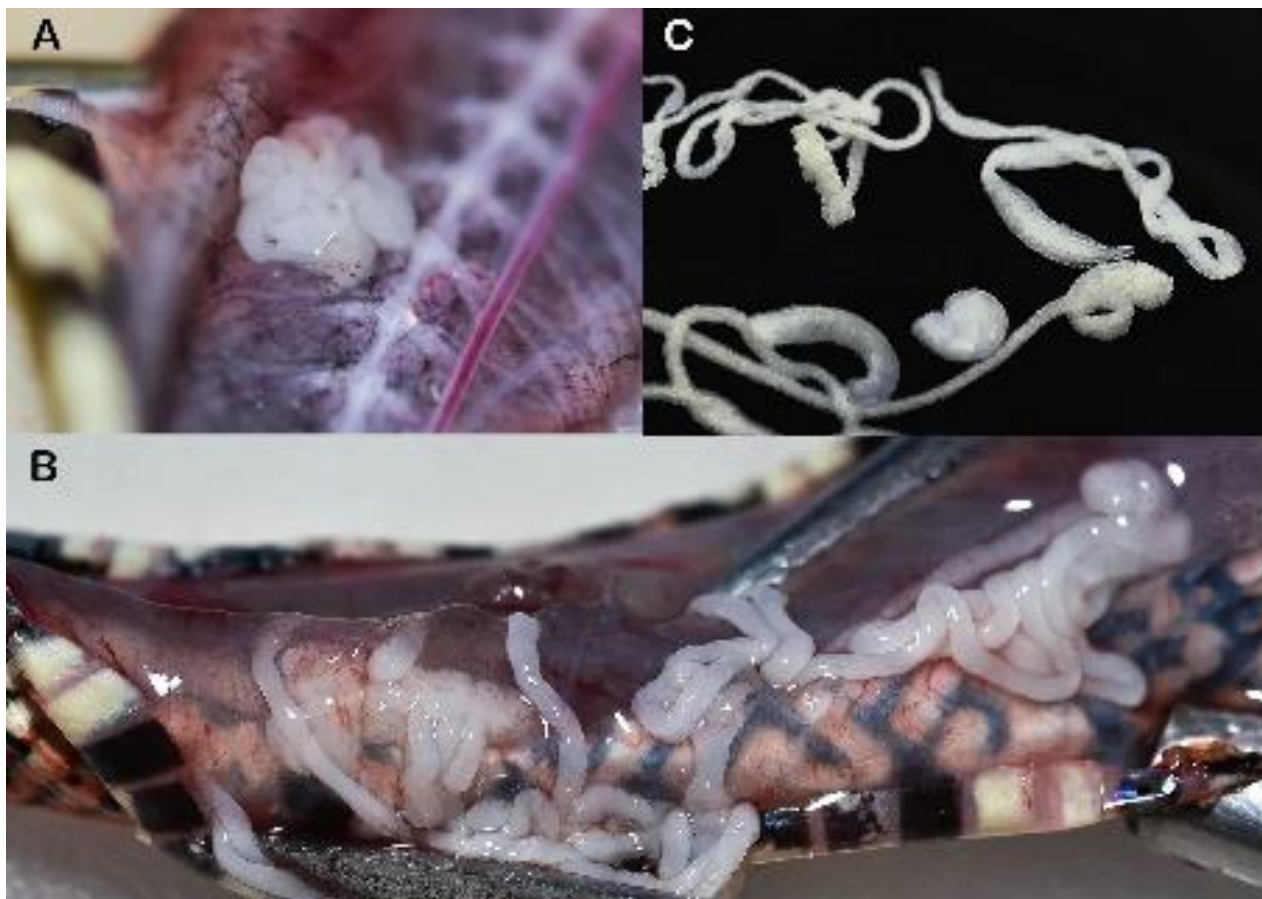


Figura 2 – Espécimes de *Spirometra* sp. sob forma de esparganos em cavidade abdominal do hospedeiro paratênico *Leptodeira pulchriceps* (Serpente olho de gato) (A e B) e removido em água MiliQ em placa (C).

Os cães e gatos experimentais não manifestaram alterações clínicas durante o período experimental, bem como não foram observados, fragmentos visíveis do cestoda nas fezes, como fora observado em relatos de infecções

naturais em cão (SAHOO et al., 2018), gato (LIMA et al., 2020) e canídeos silvestres (ALMEIDA et al., 2016; EOM et al., 2018; EOM et al., 2019; NDOSSI et al., 2020), tampouco como vômitos em felinos infectados naturalmente (KIM et al., 2021).

Os ovos foram observados nas fezes dos animais experimentais a partir do 13º dia pós inoculação no G1 e somente a partir do 20º dia no C1 (quadro 9). Apresentavam como características, cor amarelada, operculados e formato ovóide. O tamanho médio dos ovos se encontra no quadro 5:

Quadro 5: Tamanho dos ovos, em micras, observados em fezes de cães e gatos infectados experimentalmente com plerocercoides de *Spirometra*.

Espécie hospedeira	Comprimento	Largura	Média Comprimento/largura
CÃES	54,722 a 62,110	32,264 a 35,676	58,42 / 33,97
GATOS	50,29 a 58	30,656 a 36,111	54,15 / 33,38

O gato G2 e o cão C4 não apresentaram *Spirometra* sp. adultos à necropsia, embora tenham sido observados ovos nas fezes previamente. O primeiro animal experimental foi necropsiado no 22º dia e os últimos, aos 45 dias após a inoculação. Os animais necropsiados entre o 22º e 37º dia após a inoculação apresentaram maior número de espécimes de parasitos à necropsia, entre 10 e 16 exemplares (representando 33,3% a 64% do número de plerocercoides inoculados em cada um desses animais). As imagens podem ser observadas na figura 3. Esses números reduziram drasticamente quando comparados aos animais necropsiados a partir do 38º dia, com nenhum exemplar adulto recuperado, apenas um exemplar recuperado em um dos animais necropsiados no 45º dia (representando 3,2% do inoculado) e nenhum exemplar no outro animal necropsiado no 45º dia, conforme Quadro 6. Essas observações podem indicar que o cão e o gato doméstico não são hospedeiros adequados para manutenção da infecção por longo período ou como relatado por OPUNI & MULLER (1974), que observaram ovos nas fezes de cães inoculados experimentalmente a partir dos 19 dias, em um experimento que durou 9 meses, e relataram picos de eliminação de ovos a cada 3 ou 4 semanas, intercalado por período sem eliminação de ovos, o que atribuíram ao provável fato de uma

quantidade de proglótides que estavam produzindo grande quantidade de ovos se libertarem e em seguida, eliminadas pelo intestino.

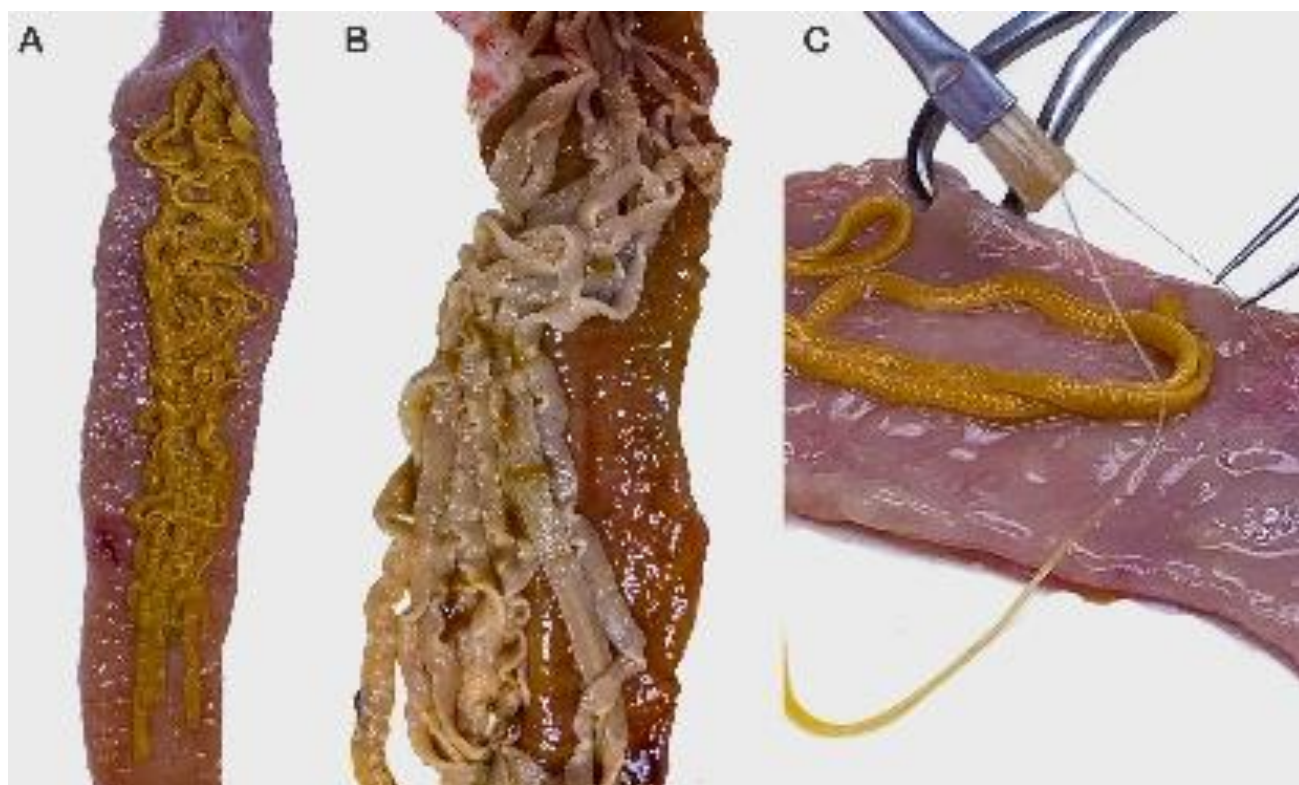


Figura 3 – Espécimes adultos de *Spirometra* sp. no intestino delgado de cão portador de infecção induzida com esparganos (A e B), e em C detalhe do espécime fixado pelo escólice.

O C4 apresentou extensas lesões avermelhadas no duodeno e mancha esbranquiçada no baço. Os demais animais não apresentaram lesões macroscópicas. Os parasitas adultos estavam com o escólice fixado no duodeno em todos os animais, e seu estróbilo se estendia até o jejuno ou íleo. Os resultados das infecções experimentais como o número de dias após a inoculação em que foram visualizados ovos no exame coproparasitológico, número de dias após a inoculação em que foi realizada a necropsia, número de espécimes de parasitos adultos recuperados, por animal experimental, estão descritos no quadro 6:

1734 **Quadro 6:** Resultados das inoculações experimentais em cães e gatos domésticos com
 1735 plerocercóides de *Spirometra* sp. recuperados em répteis, capturados na região da Nhecolândia,
 1736 Pantanal, MS.

Animal experimental	Número de dias após a inoculação, em que foram observados ovos nas fezes	Número de dias após a inoculação, em que foi realizada a necropsia	Número de exemplares adultos recuperados	Alterações macroscópicas e outros achados
C1	20	45	1	-
C2	17	32	10	-
C3	17	22	11	-
C4	17	38	0	Extensas lesões avermelhadas no duodeno; lesão esbranquiçada no baço.
G1	13	37	11	-
G2	17	45	0	-
G3	14	27	16	-

1737

1738 Os parasitos adultos recuperados mediram entre 43 e 49,8cm, eram
 1739 achatados e apresentavam escólice e colo finos e não segmentados; o estróbilo
 1740 segmentado, craspedota, composto por proglótides que se tornavam mais largas
 1741 a medida que se afastavam do colo.

1742 Microscopicamente, pôde ser observado duas bótrias longitudinais no
 1743 escólice. O poro uterino, vagina e poro genital eram visíveis na parte ventral de
 1744 cada proglótide. Em cada proglótide grávida, o útero estava localizado no centro
 1745 apresentando duas a três voltas, e repleto de ovos. O ovário apresenta formato de
 1746 haltere, e se localiza conectado ao útero, próximo à margem posterior da
 1747 proglótide. O cirro e o poro vaginal apresentam aberturas separadas, localizados
 1748 na linha média da porção anterior da proglótide, com o poro vaginal posterior ao
 1749 cirro. O poro genital engloba a bolsa do cirro e a vesícula seminal. Os testículos
 1750 numerosos e estavam espalhados tanto nas camadas mais medianas como
 1751 dorsais, e bilateralmente em cada proglótide. Na mesma região também haviam

feixes musculares distribuídos no sentido longitudinal. As proglótides estavam revestidas por tecido epitelial. As imagens histológicas, microscópicas e de microscopia de varredura podem ser observadas nas figuras 4 e 5.

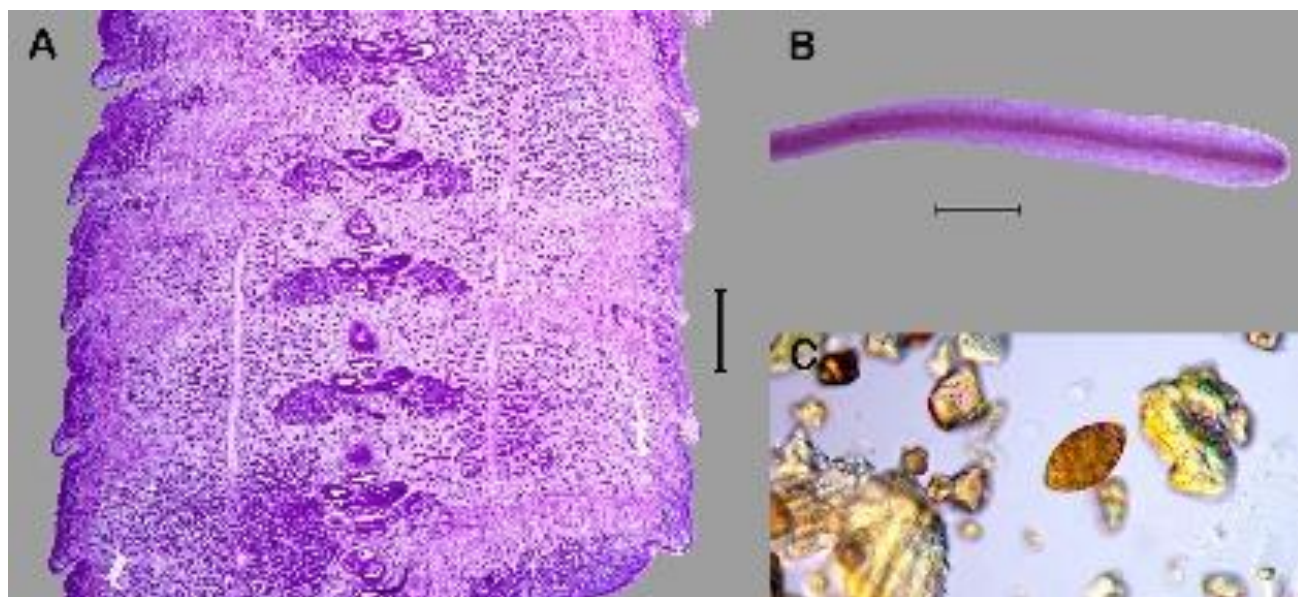


Figura 4 – Porção do estróbilo de *Spirometra* sp. em corte histológico transversal (A) corado pela hematoxilina-eosina; B- escólice de espécime adulto corado pelo carmim-clorídrico e, C, ovo de *Spirometra* observado nas fezes de cão portador da infecção induzida por esparganos. (Barra de escala = 500 µm).

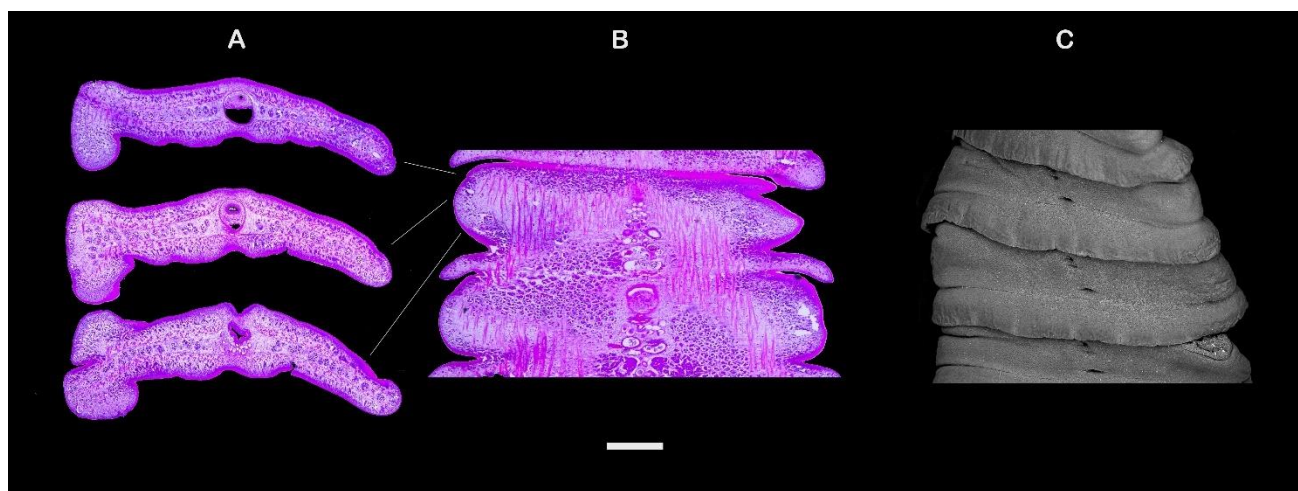


Figura 5 – Imagens de proglotes de *Spirometra* sp. obtidas em infecção induzida em cão doméstico por esparganos. A- Cortes histológicos transversais sequenciais na mesma proglote madura, proximais, mediais e distais, respectivamente, e corados pela hematoxilina-eosina; B- corte histológico longitudinal em proglotes maduras corado pela hematoxilina-eosina, e C- imagem de proglotes maduras em microscopia eletrônica de varredura. (Barra de escala = 500 µm).

Os caracteres taxonômicos observados são fracos, fortemente subjetivos e sujeitos à interpretações diversas, não existindo caracteres específicos para diagnóstico dessa espécie, e consequentemente a análise morfológica foi inconclusiva, como também relatado por diversos autores (SCHOLZ et al., 2019,

YAMASAKI et al., 2021), além de ocorrerem variações na morfologia, de acordo com o hospedeiro, porte, idade, localização geográfica, e método de conservação da amostra, podendo esses fatores resultar até mesmo em divergências interespecíficas (KUCHTA & SCHOLZ, 2017; WAESCHENBACH et al., 2017).

Embora o gene *cox1* seja o mais utilizado em sequenciamentos para identificação molecular do gênero *Spirometra*, e considerado como “padrão ouro” (KUCHTA et al., 2024), alguns autores utilizaram sequenciamentos parciais do gene, a exemplo de PETRIGH et al. (2015) que sequenciaram 450 pares de base de amostras do parasito adulto, resultando em 93% de similaridade com *S. proliferum* e 89% de similaridade com *S. erinaceieuropaei*, demonstrando que sequências parciais não são suficientes para discriminar as espécies com segurança.

O sequenciamento completo do gene *cox1* resultou em sequências de 1568 pares de base, denominadas aqui de *Spirometra* Pantanal-BR-3 e *Spirometra* Pantanal-BR-5, que foram analisadas no MEGA11 junto às demais sequências completas do gene *cox1* do gênero *Spirometra*, disponíveis no GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Essa análise revelou que nossa sequência não se encaixa em nenhum outro grupo, tendo ancestralidade comum com *Spirometra folium* (Syn. *S. theileri*) (NC056327.1, MK955901.1), que por sua vez, apresenta ancestralidade comum com *Spirometra asiana* (LC375851.1, LC375852.1, LC375853.1, LC375854.1, LC375855.1). O grupo onde se encontram os isolados de *S. erinaceieuropaei* é bastante consistente, assim como o grupo *Spirometra decipiens*. Os demais isolados analisados mostram-se dispostos de maneira incongruente, o que corrobora com conclusões de outros autores, que afirmam que o gênero necessita de uma revisão sistemática (BADRI et al., 2017). As figuras 6 e 7 mostram as árvores de consenso e original com destaque para regiões geográficas e a figura 8, a árvore original contendo *outgroup*, geradas por Máxima Verossimilhança:

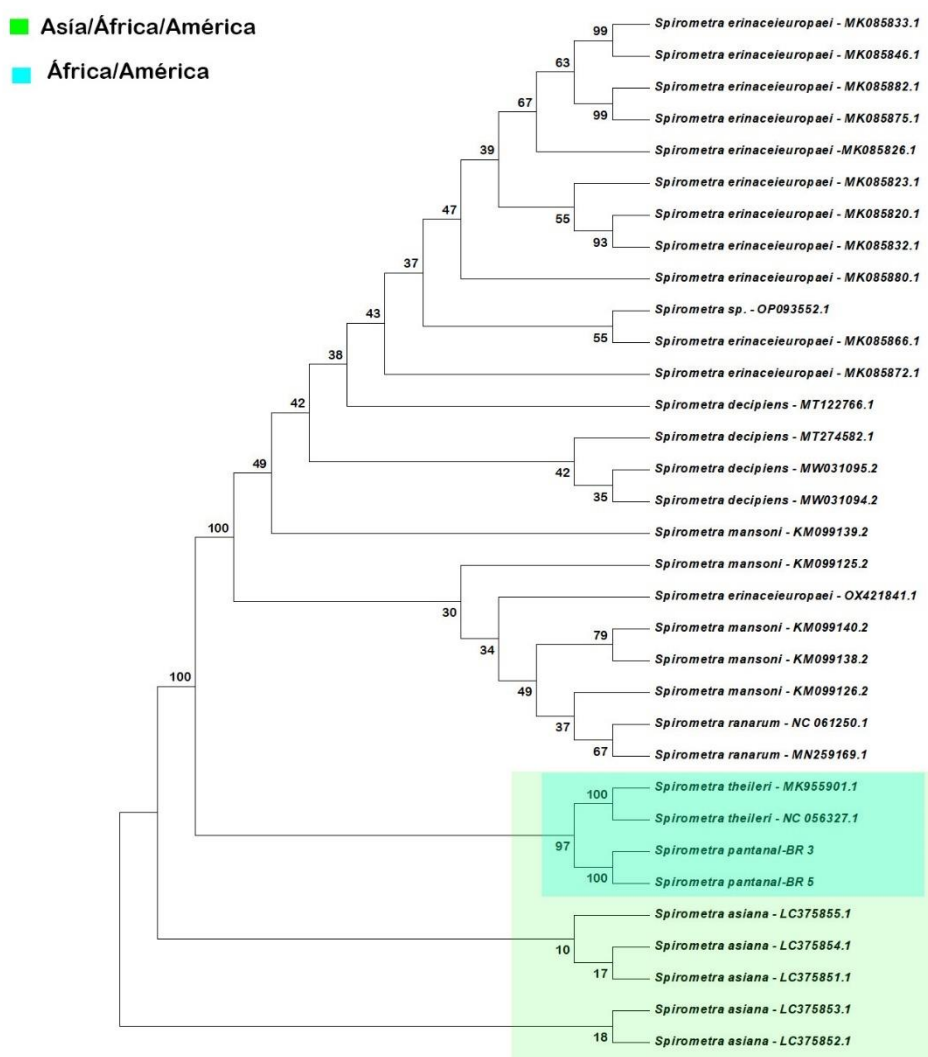


Figura 6 – Árvore de consenso inferida por Máxima Verossimilhança (ML) pelo método Hasegawa-Kishino-Yano com alta semelhança logarítmica (-5479,30). As porcentagens nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada acima dos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias em pares estimadas usando a abordagem *Maximum Composite Likelihood* (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de log likelihood superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,2399)). Esta análise envolveu 33 sequências de nucleotídeos, com um total de 1568 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no software MEGA 11. As espécies do grupo África/América estão destacadas em azul e aquelas que se agrupam na Ásia/África/América em verde.

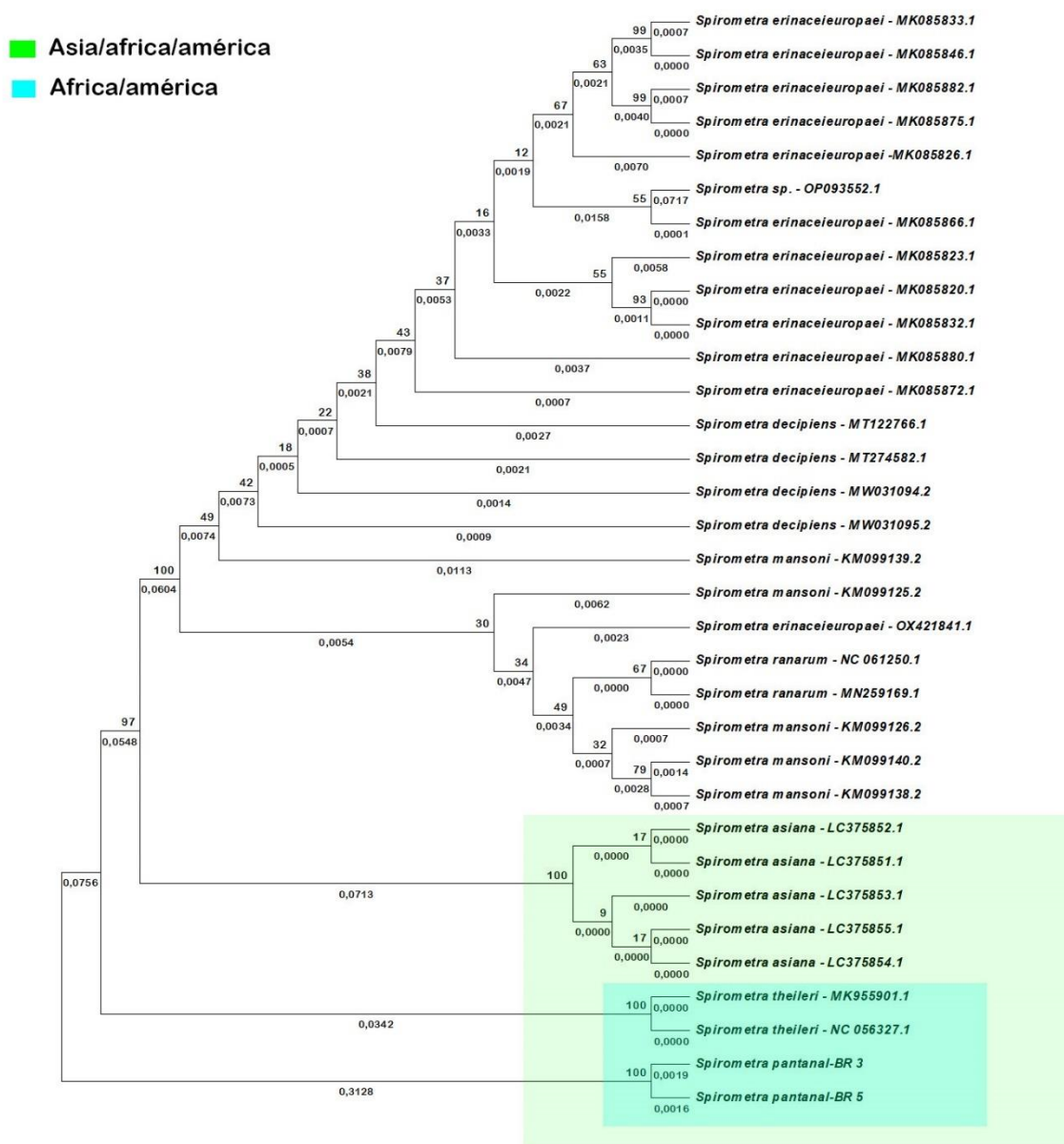


Figura 7 – Árvore original inferida por Máxima Verossimilhança (ML) pelo método Hasegawa-Kishino-Yano com alta semelhança logarítmica (-5479,30). As porcentagens nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada acima dos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias em pares estimadas usando a abordagem Maximum Composite Likelihood (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de log likelihood superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,2399)). Esta análise envolveu 33 sequências de nucleotídeos, com um total de 1568 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no software MEGA 11. As espécies do grupo África/América estão destacadas em azul e aquelas que se agrupam na Ásia/África/América em verde.

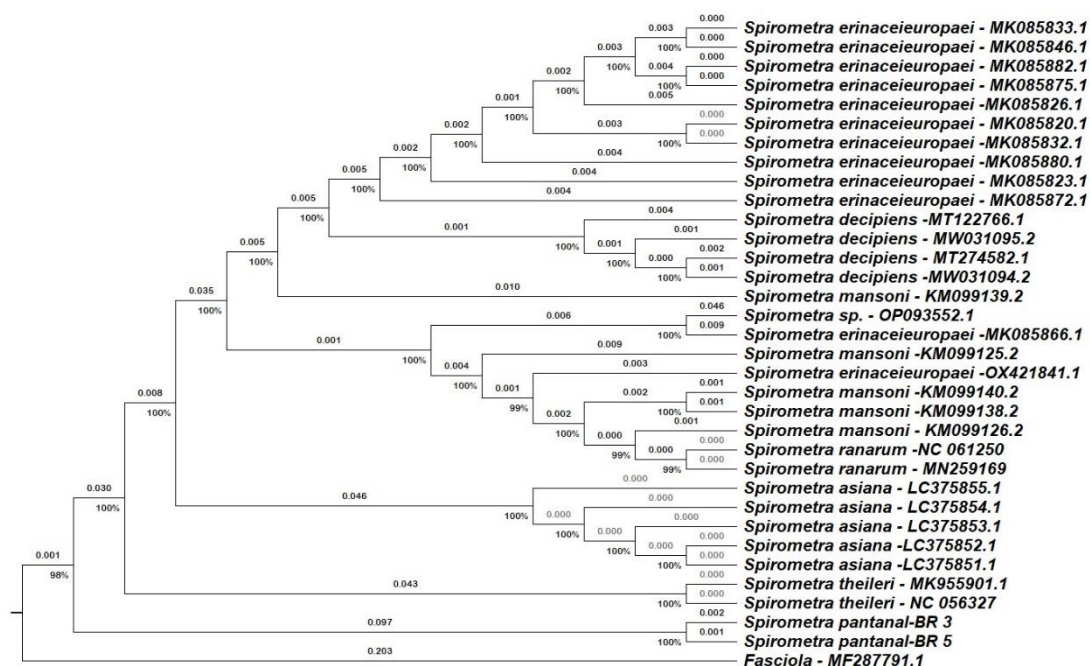


Figura 8 – Árvore original, contendo *Fasciola* spp. como grupo externo, inferida usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Hasegawa-Kishino-Yano, com a maior verossimilhança logarítmica (-6735,50) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada abaixo dos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de verossimilhança logarítmica superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,7535)). Esta análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos, com um total de 1569 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no software MEGA 11.

A estimativa de divergência evolutiva entre as 33 sequências analisadas mostra que os isolados *Spirometra* Pantanal-BR-3 e *Spirometra* Pantanal-BR-5 apresentam as maiores distâncias, revelando serem as sequências mais evolutivamente afastadas entre todas as demais comparadas, conforme pode ser observado no quadro 4, no anexo.

As sequências do isolado também foram submetidos às ferramentas para delimitação de espécies, cujos resultados foram:

Pelo método ABGD discriminou cinco diferentes grupos:

- o Grupo 0, contendo 23 sequências (*Spirometra erinaceieuropaei* - MK085820.1, *Spirometra erinaceieuropaei* - MK085823.1, *Spirometra erinaceieuropaei* -

1848 MK085826.1, *Spirometra erinaceieuropaei* - MK085833.1, *Spirometra*
 1849 *erinaceieuropaei* -MK085832.1, *Spirometra erinaceieuropaei* - OX421841.1,
 1850 *Spirometra mansonii* -KM099140.2, *Spirometra mansonii* - KM099139.2,
 1851 *Spirometra mansonii* - KM099138.2, *Spirometra mansonii* - KM099126.2,
 1852 *Spirometra mansonii* - KM099125.2, *Spirometra erinaceieuropaei* - MK085882.1,
 1853 *Spirometra erinaceieuropaei* - MK085880.1, *Spirometra erinaceieuropaei* -
 1854 MK085875.1, *Spirometra erinaceieuropaei* - MK085872.1, *Spirometra*
 1855 *erinaceieuropaei* - MK085866.1, *Spirometra erinaceieuropaei* - MK085846.1,
 1856 *Spirometra decipiens* - MT274582.1, *Spirometra decipiens* - MT122766.1,
 1857 *Spirometra decipiens* - MW031095.2, *Spirometra decipiens* -MW031094.2,
 1858 *Spirometra ranarum* - NC 061250.1, *Spirometra ranarum* - MN259169.1),
 1859 - o Grupo 1 contendo cinco sequências (*Spirometra asiana* - LC375855.1,
 1860 *Spirometra asiana* - LC375854.1, *Spirometra asiana* - LC375853.1, *Spirometra*
 1861 *asiana* - LC375852.1, *Spirometra asiana* - LC375851.1),
 1862 - o Grupo 2, contendo duas sequências (*Spirometra folium* (Sin. *S. theileri*) -
 1863 MK955901.1, *Spirometra folium* (Sin. *S. theileri*) - NC 056327.1),
 1864 - o Grupo 3, onde estão as duas sequências deste trabalho (*Spirometra pantanal-*
 1865 *BR 3* e *Spirometra pantanal-BR 5*) e
 1866 - o grupo 4 com apenas uma sequência (*Spirometra* sp. - OP093552.1).
 1867 O método ASAP também separou as 33 sequências de nucleotídeos em
 1868 cinco grupos, com a realização de dez partições, e apresenta a mesma
 1869 distribuição que os grupos observados no ABGD, e seu resultado é demonstrado
 1870 pelo gráfico na figura 9:

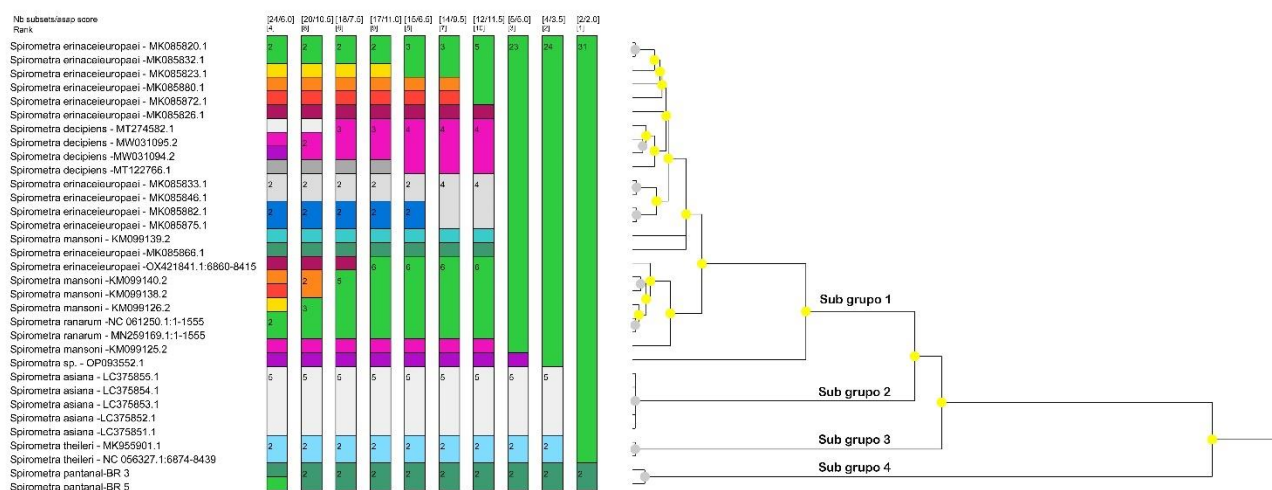


Figura 9 – Árvore construída no software ASAP - Assemble Species by Automatic Partitioning (<https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/asap.zip>) para o qual foi utilizado o arquivo fasta do alinhamento ClustalW de 33 sequencias, com cerca de 1569 nucleotídeos. Sendo o escore Asap: 3.500000, com probabilidade igual a 5.349301e-01 e identificados 5 sub grupos principais, sendo um grupo desordenado.

O método GMYC resultou em 5 espécies, que foram agrupadas de acordo com a imagem gráfica abaixo (Figura10):

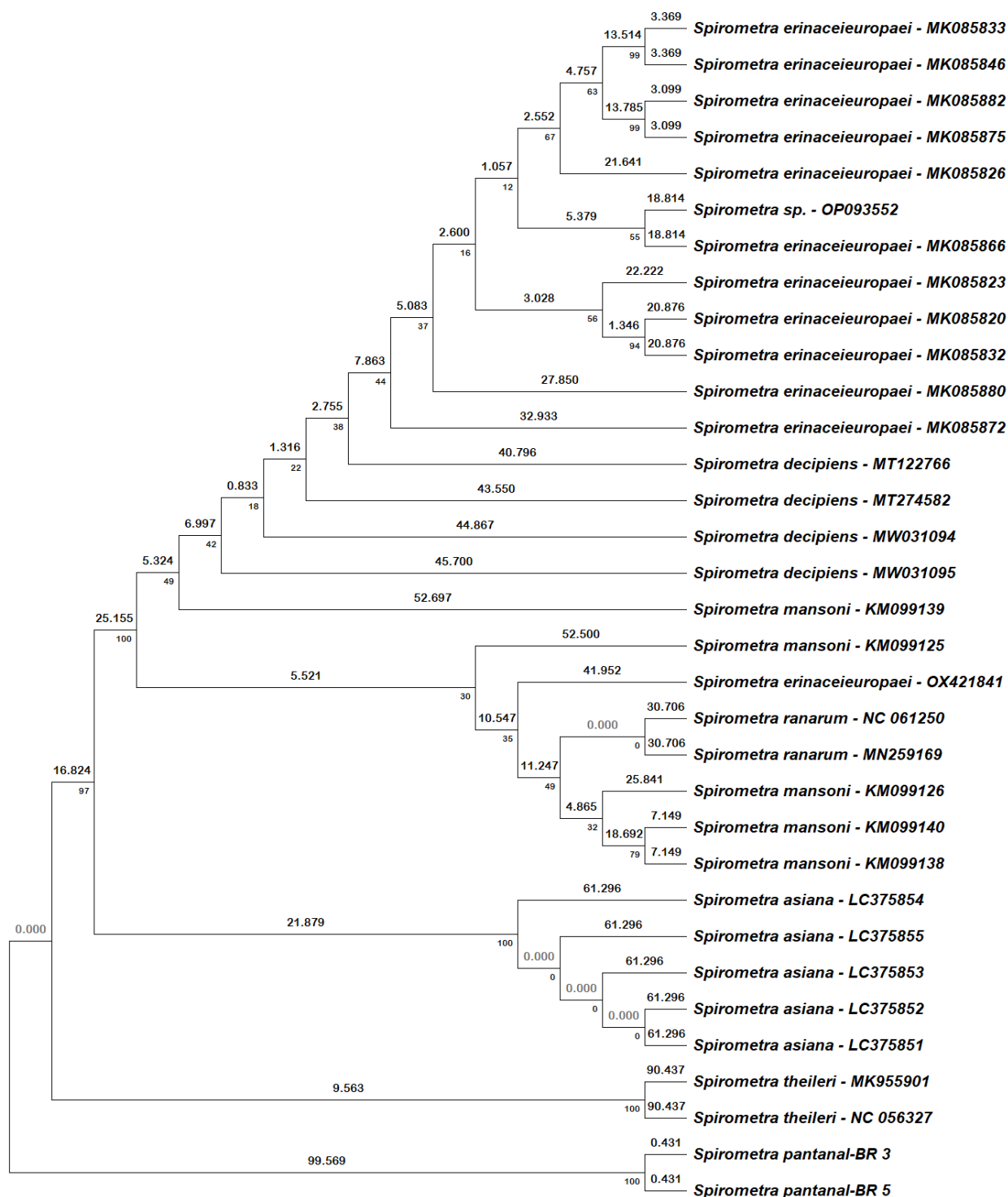


Figura 10: Árvore construída no software GMYC - Generalized Mixed Yule Coalescent (<https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/pyr8s.zip.zip>) para o qual foi utilizado o arquivo fasta do alinhamento ClustalW com 33 sequencias, com cerca de 1569 nucleotídeos.cada. Cinco subgrupos foram identificados: 1- *Spirometra* Pantanal br; 2- *Spirometra folium* (Sin. *S. theileri*); 3- *Spirometra asiana*; outros dois subgrupos (4 e 5) com as demais espécies analisadas, distribuídas de forma mesclada entre os conjuntos.

Já o método PTP e bPTP apresentaram o mesmo resultado, com 5 diferentes grupos, conforme exibido na figura 11:

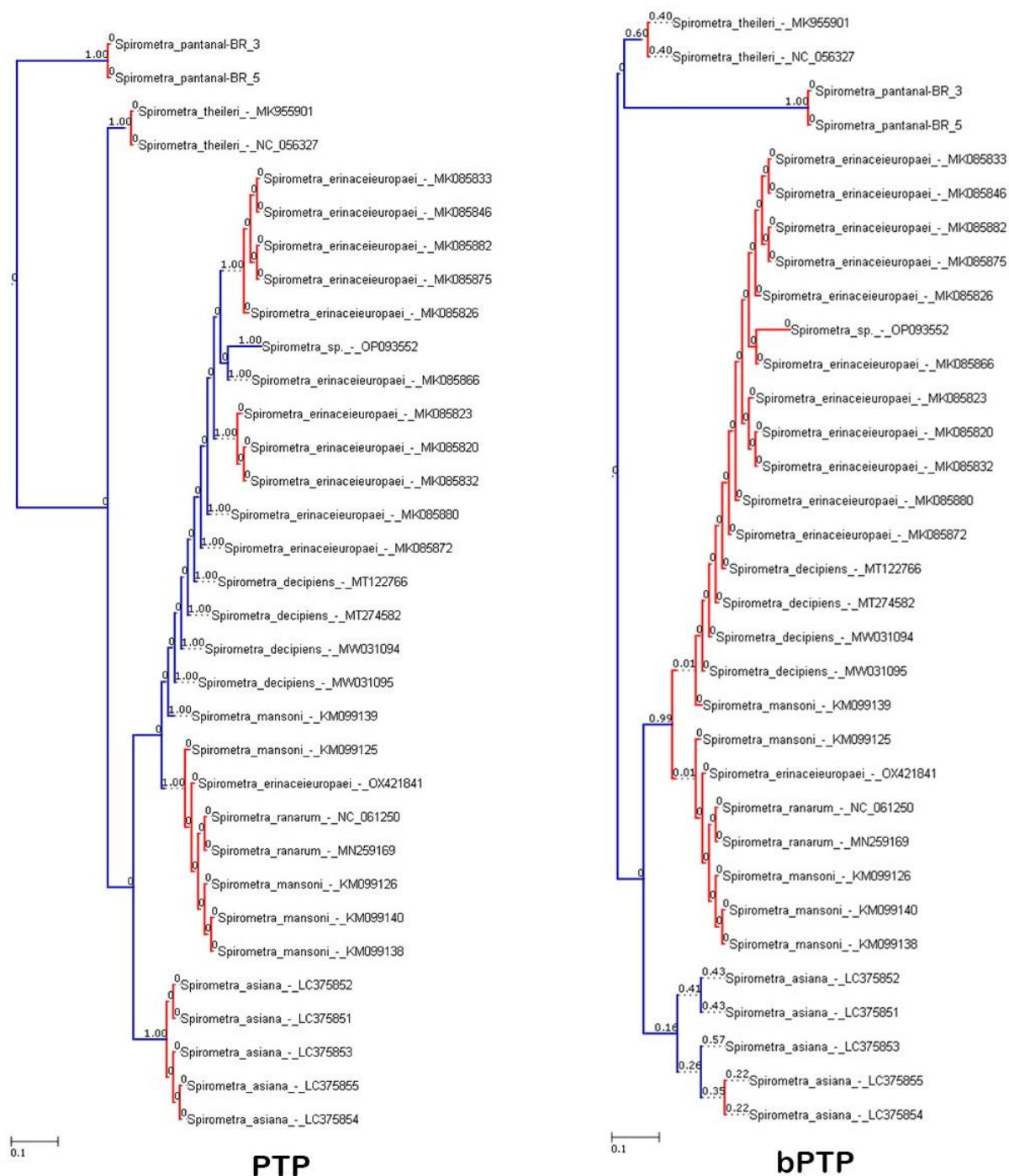


Figura 11: Árvores construídas no software PTP - Poisson Tree Processes, para delimitação de espécies, disponível em <https://itaxotools.org/download.html#hyperlinkDelimit> - <https://itaxotools.org/ptp.zip>, para as quais foi empregado o arquivo tipo Newick, gerado após a construção da árvore em ML no software MEGA 11, com as 33 sequências, com cerca de 1569 nucleotídeos cada. Em ambas as análises PTP e bPTP, cinco subgrupos foram identificados: 1- *Spirometra* Pantanal br; 2- *Spirometra folium* (Sin. *S. theileri*); 3- *Spirometra asiana*; outros dois subgrupos (4 e 5) com as demais espécies analisadas, distribuídas de forma mesclada entre os conjuntos.

Diante dos resultados obtidos através da análise das árvores construídas pelo método de Máxima Verossimilhança e das ferramentas de delimitação de

espécies, é incontestável a conclusão que nossos isolados tratam-se de uma espécie nova, e, ao contrário do que afirmam outros autores (ALMEIDA et al., 2016, KUCHTA et al., 2022; YAMASAKI et al., 2023; KUCHTA et al., 2024) sobre a ocorrência predominante de *Spirometra decipiens* sp 1 e sp 2 nas Américas, nossas amostras diferenciam-se claramente desses grupos, estando mais próximas da *Spirometra folium* (Sin. *S. theileri*) e da *Spirometra asiana*.

Claramente revelamos uma nova espécie, confirmada pelo sequenciamento completo do gene *cox1*, com 1568 pares de base que foram analisados e comparados com outras sequências também completas do mesmo gene, e que se destaca das demais na árvore. Além disso, como recomendado por KUCHTA et al. (2024), por não haver ligação com descrições anteriores relacionadas a hospedeiros e ligação geográfica, deve ser proposta como uma nova espécie.

6. CONCLUSÃO

As amostras de *Spirometra* isoladas na região da Nhecolândia, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil, tratam-se de uma nova espécie de *Spirometra*, que utiliza répteis e anfíbios endêmicos na região, como segundo hospedeiros intermediários, para a sua forma infectante, e capaz de infectar cães e gatos. Considerando os relatos da literatura, é recomendável que se considere o seu potencial zoonótico, o que acende um alerta a toda a rede de saúde pública da região.

Foram registrados pela primeira vez como hospedeiros intermediários de *Spirometra* cobras das espécies *Bothrops matogrossensis*, *Erythrolamprus typhlus*, *Leptodeira pulchriceps*, *Leptophis ahaetulla*, *Mussurana bicolor*, *Taeniophallus occipitalis*, *Xenodon matogrossensis* e *Micrurus frontalis*, assim como anfíbio da espécie *Leptodactylus chaquensis*.

7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO

Este estudo acende um alerta para a ocorrência de um parasita com potencial zoonótico nunca antes descrito na região.

No campo da saúde pública, as autoridades sanitárias deverão ser comunicadas sobre seu potencial, além de aspectos epidemiológicos e clínicos.

Na área veterinária, clínicos veterinários, principalmente de pequenos animais, também deverão estar atentos à ocorrência do parasita na região, afim de adotarem condutas diagnósticas, tratamentos, e adequada orientação aos tutores e população.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.P.; REIS, D.O.; MOREIRA, M.D.; PALMEIRA, S.B.S. 2006. **Cisticercos em bovinos procedentes de minas gerais e abatidos em frigoríficos de Uberlândia - MG, no período de 1997 a 2001.** *Higiene Alimentar*, v.20, n.139, p.40-43.
- ALMEIDA G.G., COSDCARELLI D., MELO M.N., MELO A.L. PINTO H.A. 2016. **Molecular identification of *Spirometra* spp. (Cestoda: Diphyllbothriidae) in some wild animals from Brazil.** *Parasitology International*, Oct;65(5 Pt A):428-31.
- ANANTAPHRUTI M.T., NAWA Y., VANVANITCHAI Y. 2011. **Human Sparganosis in Thailand: An Overview.** *Acta Tropica* 118, 171-176.
- AMATO J.R.F., AMATO S.B. 2010. **Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves.** In S. Von Matter, F. C. Straube, V. de Queiroz Piacentini, I. A. Accordi, & J. J. F. Cândido (Eds.), *Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento* (pp. 369-393). Rio de Janeiro, RJ: Technical Books.
- BADRI M., ESLAHI A.V., MAJIDIANI H., PIRESTANI M. 2017. ***Spirometra erinaceieuropaei* in a wildcat (*Felis silvestris*) in Iran.** *Veterinary Parasitology: Regional studies and reports*, 10, 58-61.
- BADRI M., OLFATIFAR M., KARIMIPOURSARYAZDI A., ZAKI L., CARVALHO L.M.M., HARANDI M.F., BARIKBIN F., MADANI P, ESLAHI A.V. 2022. **The Global prevalence of *Spirometra* parasites in snakes, frogs, dogs and cats: A systematic review and meta-analysis.** *Vet Med Sci.* 2022;8:2785-2805.
- BAUCHET A.L., JOUBERT C., HEILES J.M., LACOUR S.A., BOSQUET N., GRAND R.L., GUILLOT J., LACHAPPELLE F. 2013. **Disseminated Sparganosis in a *Cynomolgus* Macaque (*Macaca fascicularis*).** *J. Comp. Path.*, Vol. 148, 294-297.
- ČISOVSKÁ BAZSALOVICSOVÁ E, RADAČOVSKÁ A, LAVIKAINEN A, KUČHTA R, KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ I. 2022. **Genetic interrelationships of *Spirometra erinaceieuropaei* (Cestoda: Diphyllbothriidea), the causative agent of sparganosis in Europe.** *Parasite.* 2022;29:8.
- BERGER L., SKERRATT L.F., ZHU X., YOUNG S., SPEARE R. 2009. **Severe Sparganosis in Australian Tree Frogs.** *Journal of Wildlife Diseases*, 45 (4), 921-929.
- BEVERIDGE I., FRIEND S., JEGANATHAN N., CHARLES J. 1998. **Proliferative sparganosis in Australian dogs.** *Aust Vet J* vol. 76, n. 11.
- BEZERRA C.H., BRAGA R.R., NOJOSA D.M.B., SILVA G.A. 2012. **Occurrence of spargana infection in *Dermatonotus* Mueller Better, 1885 (Anura, Micrihylidae) from a coastal complex in northeastern Brazil.** *Herpetology notes*, vol. 5: 69-71.
- BOONYASIRI A., CHEUNSUCHON P., SUPUTTAMONGKOL Y., YAMASAKI H., SANPOOL O., MALEEWONG W., INTAPAN P.M. 2014. **Nine human**

- 1983 **sparganosis cases in Thailand with molecular identification of causative**
 1984 **parasite species. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, 91(2), pp 389-393.**
 1985
- 1986 BRABEC J., URIBE M., CHAPARRO-GUTIERREZ J.J., HERMOSILLA C. 2022.
 1987 **Presence of *Spirometra mansonii*, Causative Agent of Sparganosis, in**
 1988 **South America. *Emerging Infectious Diseases*, vol 28 n 11.**
 1989
- 1990 BRASIL, MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E
 1991 ABASTECIMENTO. **Circular 129/2002/DCI/DIPOA. Brasília: Departamento**
 1992 **de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 2002.**
 1993 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010.
 1994 **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças**
 1995 **transmitidas por alimentos.**
 1996 BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2019. **Relatório sobre áreas**
 1997 **prioritárias para o manejo de javalis: aspectos ambientais,**
 1998 **socioeconômicos e sanitários.**
- 1999 BROGLIA, A.; KAPEL, C. 2011. **Changing dietary habits in changing world:**
 2000 **emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses.**
 2001 *Veterinary Parasitology*, v.182, p.2-13.
- 2002 CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) - 2011. **DPDx,**
 2003 **Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern Center**
 2004 **for Global Health.** Acesso em 04.07.2022. [http://www.dpd.](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Sparganosis.htm)
 2005 [cdc.gov/dpdx/HTML/Sparganosis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Sparganosis.htm)
- 2006 CHEN S.Y., GONG T.F., HE J.L., LI F., LI W.C., XIE L.X., XIE X.R., LIU Y.S.,
 2007 ZHOU Y.F., LIU W. 2022. **Molecular Characterization and phylogenetic**
 2008 **analysis of *Spirometra* tapeworms from snakes in Hunan Province. *Vet.***
 2009 ***Sci.* 9, 62.**
- 2010 CHERVY L. 2002. **The terminology of larval cestodes or metacestodes.**
 2011 *Systematic Parasitology* 52: 1-33 .
 2012
- 2013 CHI J.G, CHI H.S., LEE S.H. 1980. **Gistopathologic Study on Human**
 2014 **Sparganosis. *The Korean Journal of Parasitology*, vol 18, n.1, 15-23.**
- 2015 CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). 2012. **Resolução**
 2016 **N. 1000 de 11 de maio de 2012.**
- 2017 COSTA A.C., SOLARI A., SILVA S.F.S.M., MARTIN G., CAMACHO M., DUARTE
 2018 A.N., NOGUEIRA J.M.R., GABRIEL D.A., NOVO S.P. 2019. **Ancient parasite**
 2019 **analysis and zoonotic potential of *Spirometra* sp. in two related sites**
 2020 **from Pernambuco, Brazil. *Journal of Parasitology*, 105(5), 755-759.**
- 2021 CURI N.H.A., ARAÚJO A.S., CAMPOS F.S., LOBATO Z.I.P., GENNARI S.M.,
 2022 MARVULO M.F.V, SILVA J.C.R., TALAMONI S.A. 2010. **Wild Canids,**
 2023 **domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats**
 2024 **for canid conservation. *Biodivers Conserv* 19: 3513-3524.**
- 2025 DE QUEIROZ, K. 2007. **Species Concepts and Species Delimitation. *Syst. Biol.***
 2026 **56(6):879-886.**
 2027
- 2028 DIRGAHAYU P., FUKUMOTO S., TADEMOTO S., KINA Y., HIRAI K. 2004.
 2029 **Excretory/secretory products from plerocercoids of *Spirometra***

- 2030 **erinaceieuropaei suppress interleukin-1B gene expression in murine**
 2031 **macrophages. *International Journal for Parasitology*: 34, 577-584.**
- 2032 EOM K.S., PARK H., LEE D., CHOE S., KANG Y., BIA M.M., LEE S.H., KEYYU
 2033 J., FYUMAGWA R., JEON H.K. 2018. **Molecular and Morphologic**
 2034 **identification of *Spirometra* ranarum found in the stool of African lion,**
 2035 ***Panthera Leo* in the Serengeti plain of Tanzania. *Korean J. Parasitol*, v 56,**
 2036 **n 4: 379-383.**
- 2037 EOM K.S., PARK H., LEE D., CHOE S., KANG Y., BIA M.M., NDOSI B.A., NATH
 2038 T.C., EAMUDOMKARN C., KEYYU J., FYUMAGWA R., JEON H.K. 2019.
 2039 **Identity of *Spirometra* theileri from a Leopard (*Panthera pardus*) and**
 2040 **Spotted Hyena (*Crocota crocuta*) in Tanzania. *Korean J. Parasitol*, v 57, n**
 2041 **6 639-645.**
- 2042 EOM K.S., PARK H., LEE D., CHOE S., KANG Y., BIA M.M., LEE S.H., KEYYU
 2043 J., FYUMAGWA R., JEON H.K. 2018. **Molecular and Morphologic**
 2044 **identification of *Spirometra* ranarum found in the stool of African lion,**
 2045 ***Panthera Leo* in the Serengeti plain of Tanzania. *Korean J. Parasitol*, v 56,**
 2046 **n 4: 379-383.**
- 2047 FABIAN M.B., PERALTA J.S., ALVAREZ N.C., LOSSIO D.A., SERRANO R.C.,
 2048 TERRONES K.T., ZAMBRANO M.C., BELTRAN S.E. 2015. **Infestacion**
 2049 **ocular por plerocercos de *Spirometra* mansonoides: primer reporte en**
 2050 **el Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(2):391-4.**
- 2051 FELSENSTEIN J. 1985. **Confidence limits on phylogenies: An approach using**
 2052 **the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.**
- 2053 FERRAZ A., PIRES B.S., BARWALDT E.T., SANTOS E.M., DALLMANN P.R.J.,
 2054 CASTRO T.A., NOBRE M.O., NIZOLI L.Q. 2020. ***Spirometra* mansonoides**
 2055 **em fezes de felino doméstico no município de Pelotas, RS, Brasil, relato**
 2056 **de caso. *Scire Salutis*, Vol.10, n.1, p.10-13.**
- 2057 FIORELLO D.V.M., ROBBINS R.G., MAFFEI L., WADE S.E. 2006. **Parasites of**
 2058 **free-ranging small canids and felid in Bolivian Chaco. *Journal of Zoo and***
 2059 ***Wildlife Medicine* 37(2): 130-134.**
- 2060 FINSTERER J. & AUER H. 2013. **Parasitoses of the human central nervous**
 2061 **system. *Journal of Helminthology*, 87, 257-270.**
- 2062 FORTES E. & HOFFMANN R.P. 1987. **Registro de Platelminhos em ofídios do**
 2063 **Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, 15/16: 23-5.**
- 2064 FREDES F., MERCADO R., SALAS I.P., SUGIYAMA H., KOBAYASHI H.,
 2065 YAMASAKI H. 2021. **Morphological observation and molecular phylogeny**
 2066 **of *Spirometra* decipiens complex 1 (Cestoda: Diphyllbothriidae) found**
 2067 **in a cat from Chile. *Parasitology International* 87, 102493.**
- 2068 FROES O.M., 1967. **Sparganose humana: o primeiro caso relatado para o**
 2069 **Brasil. In: I Congresso Latino-americano de Parasitologia, Santiago, Chile. p.**
 2070 **143.**
- 2071 FUJISAWA T. & BARRACLOUGH T.G. 2013. **Delimiting Species Using Single-**
 2072 **Locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A**

- 2073 **Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets.** *Syst. Biol.* 62(5):
2074 707-724.
- 2075 FUKUMOTO S., HIRAI K., TANIHATA T., OHMORI Y., STUEHR D.J., HAMILTON
2076 T.A. 1997. **Excretory/secretory products from plerocercoids of**
2077 ***Spirometra* erinacei reduce iNOS and chemokine mRNA levels in**
2078 **peritoneal macrophages stimulated with cytokines and/or LPS.** *Parasite*
2079 *Immunology*, 19: 325-332.
- 2080 GASTON P.M. & PABLO B. 2021. **Zoonotic parasite *Spirometra***
2081 **erinaceieuropaei in a domestic cat from Buenos Aires city, Argentina.**
2082 *Revista Argentina de Microbiologia* 53, 272-273.
- 2083 GRESSLER L.T., NOLL J.C.G., FREITAS I.B., MONTEIRO S.G. 2016.
2084 **Multiparasitism in a wild cat (*Leopardus colocolo*) (Carnivora: Felidae) in**
2085 **southern Brazil.** *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v. 25, n. 3, jul-set.
- 2086 GOMES D.C. 1984. **Philander opossum (marsupialia), a new host record for**
2087 **Sparganum of Lueheella Baer, 1924 (= *Spirometra* Mueller, 1937).** *Mem.*
2088 *Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 79(3), 369-370.
- 2089 GOMES A.H.S., CACCIACARRO E.N., MANGINI A.C.S., DIAS R.M.D.S.,
2090 LAPOLA S.R., CESAR N.P.A., CORREA M.O.A. 1996. **Esparganose**
2091 **humana. Relato de um novo caso no estado de São Paulo.** *Rev. Inst.*
2092 *Adolfo Lutz*, 56(2): 3-15.
- 2093 GONG C., LIAO W., CHINEAH A., WANG X., HOU B.L. 2012. **Cerebral**
2094 **sparganosis in children: epidemiological, clinical and MR imaging**
2095 **characteristics.** *BMC Pediatrics* 12:155.
- 2096 HA, K. Y. AND OH, I. S. 2011. **Case report: Lower extremity Sparganosis in a**
2097 **bursa.** *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 469, 2072.
- 2098 HASEGAWA M., KISHINO H., AND YANO T. 1985. **Dating the human-ape split**
2099 **by a molecular clock of mitochondrial DNA.** *Journal of Molecular*
2100 *Evolution* 22:160-174.
- 2101 HATSUSHIKA R. & OKINO T. 1987. **Studies on Head Structure of *Spirometra***
2102 **erinacei (Cestoda, pseudophyllidea) Plerocercoid by new stratching-**
2103 **fixation method.** *Kawasaki Med. J.* Vol 13: n 1, 1-5
- 2104 HEADLEY S.A., GILLEN M.A., SANCHES A.W.D., SATTI M.Z. 2012.
2105 **Platynosomum fastosum-induced chronic intrahepatic cholangitis and**
2106 ***Spirometra* spp. infections in feral cats from Grand Cayman.** *Journal of*
2107 *Helminthology* 86, 209-214.
- 2108 HIRAI K. 1997. **Characteristics of the growth hormone-like factor produced**
2109 **by plerocercoids of *Spirometra* erinacei.** *Jpn. J.Vet. Res.* 44(4): 214-215.
- 2110 HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. 1934. **The sedimentation-**
2111 **concentration method in *Schistosomiasis mansoni*.** *J Public Health.*
2112 1934;9:281-98.
- 2113 HOLLDORF E.T., SIERS S.R., RICHMOND J.Q., KLUG P.E., REED R.N. 2015.
2114 **Invaded Invaders: Infection of Invasive Brown Treesnakes on Guam by**

- 2115 **an Exotic Larval Cestoda With a Life Cycle Comprises of Non-Native**
 2116 **Hosts. *Journal Pone* 10(12).**
- 2117 HONG S.T., KIM K.J., HUH S., LEE Y.S., CHAI J.Y., LEE S.H., LEE Y.S. 1989.
 2118 **The changes of histopathology and serum anti-sparganum IgG in**
 2119 **experimental sparganosis of mice. *Kor. J. Parasitol*, 27, 261.**
- 2120 HONG Q., FENG J., LIU H., LI X., GONG L., YANG Z., YANG W., LIANG X.,
 2121 ZHENG R., CUI Z., WANG W., CHEN D. 2016. **Prevalence of *Spirometra***
 2122 ***mansoni* in dogs, cats, and frogs and its medical relevance en**
 2123 **Guangzhou, China. *International Journal of Infectious Diseases* 53, 41-45.**
- 2124 JEON H.K., PARK H., LEE D. CHOE S., KIM K.H., HUH S., SOHN W.M., CHAI
 2125 J.Y., EOM K.S. 2015. **Human infections with *Spirometra decipiens***
 2126 **plerocercoids identified by morphological and genetics analyses in**
 2127 **Korea. *Korean J. Parasitol*, v 53, n 3: 299-305.**
- 2128 JEON H.K., PARK H., LEE D., CHOE S., SOHN W.M., EOM K.S. 2016 (a).
 2129 **Molecular detection of *Spirometra decipiens* in the United States. *Korean***
 2130 ***J. Parasitol*, v 54, n 4: 503-507.**
- 2131 JEON H.K., PARK H., LEE D. CHOE S., KIM K.H., SOHN W.M., EOM K. 2016 (b).
 2132 **Genetic identification of *Spirometra decipiens* plerocercoids in**
 2133 **terrestrial snakes from Korea and China. *Korean J. Parasitol*, v 54, n 2:**
 2134 **181-185.**
- 2135 JEON H.K., PARK H., LEE D., CHOE S., EOM K.S. 2018 (a). ***Spirometra***
 2136 ***decipiens* (Cestoda: Diphyllbothriidae) collected ina heavily infected**
 2137 **stray cat from the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol*, v 56, n 1: 87-91.**
- 2138 JEON H.K., PARK H., LEE D. CHOE S., KANG Y., BIA M.M., LEE S.H., SOHN
 2139 W.M., HONG S.J., CHAI J.Y., EOM K.S. 2018 (b). **Genetic and morphologic**
 2140 **identification of *Spirometra ranarum* in Myanmar. *Korean J. Parasitol*, v**
 2141 **56, n 3: 275-280.**
- 2142 JONGTHAWIN J., INTAPAN P.M., SANPOOL O., SADAOW L., LAYMANIVONG
 2143 S., THANCHOMNANG T., MALEEWONG W. 2014. **Molecular Evidence of**
 2144 ***Spirometra erinaceieuropaei* in Snakes *Ptyas kourois* from Lao PDR and**
 2145 **Thailand and Frogs *Hoplobatrachus rugulosus* from Myanmar. *Southeast***
 2146 ***Asian J Trop Med Public Health*, vol 45, n.6**
- 2147 KAVITHA K.T., LATHA B.R., SUNDAR S.T.B, SRIDHAR R., BASITH S.A. 2013.
 2148 **Sparganosis in Russell`s viper snake: a case report. *J Parasi Dis*. 38(4),**
 2149 **394-395.**
- 2150 KIM S.M., AMPONSAH E.K., EO M.Y., CHO Y.J., LEE S.K. 2017. **Clinical**
 2151 **manifestation of a patient with forehead sparganosis. *The Journal of***
 2152 ***Craniofacial Surgery*, vol 28 n.4.**
- 2153 KIM J., OCK Y., YANG K., CHOE S., PARK K-M., LEE W-K., CHOI K-C., KIM
 2154 S., KWAK D., LEE S-H. 2021. **First Clinical Cases of Spirometrosis in Two**
 2155 **Cats in Korea. *Korean J. Parasitol*, v 59 n. 2: 153-157.**
- 2156 KLEEBAYOON A., WIWANITKIT V. **Ocular sparganosis: comment. 2023.**
 2157 ***Parasit Host Dis* 2023; 61(1):94-95.**
- 2158 KONDZIOR E., KOWALCZYK R., TOKARSKA M., BOOROWIK T., ZALEWSKI A.
 2159 SOBOCIŃSKA M.K. 2020. **Multispecies reservoir of *Spirometra***

- 2160 **erinaceiueuropaei (Cestoda: Diphylobothriidae) in carnivore communities**
 2161 **in north-eastern Poland. *Parasites & Vectors* 13:560.**
- 2162 KONG Y., CHUNG Y.B., CHO S.Y., KANG S.Y. 1994. **Cleavage of**
 2163 **immunoglobulin G by excretory-secretory cathepsin S-like protease of**
 2164 ***Spirometra mansonii* plerocercoid. *Parasitology*, 109, 611-621.**
- 2165 KUCHTA R. & SCHOLZ T. *Diphylobothriidea* Kuchta, Scholz, Brabec & Bray,
 2166 2008. In **Planetary Biodiversity Inventory (2008-2017): Tapeworms from**
 2167 **Vertebrate Bowels of the Earth.** J.N. Caira and K. Jensen (eds.). 2017.
 2168 *University of Kansas, Natural History Museum, Special Publication N. 25,*
 2169 *Lawrence, KS, USA, pp. 167-189.*
 2170
- 2171 KUCHTA R., SCHOLZ T., BARBEC J., WICHT B. 2015. ***Biology of Foodborne***
 2172 ***Parasites.* Chapter 17, p 299-326.**
- 2173
- 2174 KUCHTA R., KOŁODZIEJ-SOBOCIŃSKA M.K., BRABEC J., MLOCICKI D.,
 2175 SALAMATIN R., SCHOLZ T. 2020. **Sparganosis (*Spirometra*) in Europe in**
 2176 **the molecular era. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 72, Issue 5, 1 March**
 2177 **2021, Pages 882–890.**
- 2178 KUCHTA R., PHILLIPS A.J., SCHOLZ T. 2024. **Diversity and biology of**
 2179 ***Spirometra* tapeworms (Cestoda: *Diphylobothriidea*), zoonotic parasites**
 2180 **of wildlife.: A review. *International Journal for Parasitology: Parasites and***
 2181 ***Wildlife* 24, 100947**
- 2182 KUDO T., FUJIOKA A., KORENAGA M., YAMASAKI H., MORISHIMA Y.,
 2183 SUGIYAMA H., NAKAJIMA H. SANO S. 2017. **Molecular identification of**
 2184 **intramuscular and subcutaneous *Spirometra erinaceiueuropaei***
 2185 **sparganosis in a Japanese patient. *Journal of Dermatology*, 2017: 1-2.**
- 2186 LE A.T., DO L.Q.T., NGUYEN H.B.T., NGUYEN H.N.T., DO A.N. 2017. **Case**
 2187 **report: the first case of human infection by adult of *Spirometra***
 2188 ***erinaceiueuropaei* in Vietnam. *BMC Infectious Diseases* 17:669.**
- 2189 LEAVITT S.D., MOREAU C.S., LUMBSCH H.T. 2015. **The Dynamic Discipline of**
 2190 **Species Delimitation: Progress Toward Effectively Recognizing Species**
 2191 **Boundaries in Natural Populations. In: Upreti, D., Divakar, P., Shukla, V.,**
 2192 **Bajpai, R. (eds) *Recent Advances in Lichenology.* Springer, New Delhi.**
 2193 **https://doi.org/10.1007/978-81-322-2235-4_2**
 2194
- 2195 LEE S.H., CHAI J.Y., SEO B.S., CHO S.Y. 1984. **Two cases of Human Infection**
 2196 **by adult of *Spirometra erinacei*. *The Korean Journal of Parasitology*, vol 22,**
 2197 **n.1, 66-71.**
- 2198 LEE K.J., MYUNG N.H., PARK H.W. 2010. **A case of Sparganosis in the leg.**
 2199 ***Korean J. Parasitol*, v 48, n 4: 309-312.**
- 2200 LEE M.R., JU J.W., YANG H.W., KIM T.S., PARK M.Y., CHO S.H. 2016.
 2201 **Seropositivity and identification of paramyosin for sparganosis in the**
 2202 **Kangwon and Incheon provinces of the Republic of Korea. *Journal of***
 2203 ***Helminthology* 1-5.**

- 2204 LESCANO A.G. & ZUNT J. 2013. **Other Cestodes: sparganosis, coenurosis**
 2205 **and Taenia crassiers cisticercosis.** *Handbook of Clinical Neurology*, vol 114
 2206 (3rd series), chapt 27.
- 2207 LI M.W., SONG H.Q., LI C., LIN H.Y., XIE W.T., LIN R.Q., ZHU X.Q. 2011.
 2208 **Sparganosis in mainland China.** *International Journal of Infectious Diseases*
 2209 15, e154-156.
- 2210 LI N., XIANG Y., FENG Y., LI M., GAO B.L., LI Q.Y. 2015. **Clinical features os**
 2211 **pulmonary sparganosis.** *Am. J. Med. Sci.*, 350(6): 436-441.
- 2212 LIMA V.F., MELO H.M., SOUSA S.X., BRADÃO T.S., VAZ A.F.M. 2020.
 2213 ***Spirometra mansonoides* from a domestic cat in northeastern Brazil:**
 2214 **case report.** *Acta Veterinaria Brasilica* 14, 170-173.
- 2215 LIN X.M., LIU C.J., ZHANG H.W., ZHENG L.Y., YAN Q.Y., HE L.J., ZHAO X.D.
 2216 2010. **Epidemiological investigation on sparganosis mansonii and animal**
 2217 **experiments.** *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za*
 2218 *Zhi*, Apr;28(2):132-4.
- 2219 LIU G.H., LI C., LI J.Y., ZHOU D.H., XIONG R.C., LIN R.Q., ZOU F.C., ZHU X.Q.
 2220 2012. **Characterization of the complete mitochondrial genome sequence**
 2221 **of *Spirometra erinaceieuropaei* (Cestoda: Diphylobothriidae) from**
 2222 **China.** *Int. J. Biol. Sci.* 8(5):640-649.
- 2223 LIU Q., LI M.W., WANG Z.D., ZHAO G.H., ZHU X.Q. 2015(a). **Human**
 2224 **sparganosis, a neglected food borne zoonosis.** *Lancet infect Dis* Vol. 15
 2225 1226-35.
- 2226 LIU L.N., WANG H., JIANG P., WANG M., XU M.G., WANG L.F., QI X., ZHANG X.,
 2227 CUI J., WANG Z.Q. 2015(b). **Molecular cloning and characterization of a**
 2228 ***Spirometra erinacei* casein kinase I.** *Parasitol Res*, 114(12), 4737-4742.
- 2229 LU G., SHI D.Z., LU Y.J., WU L.X., LI L.H., RAO L.Y., YIN F.F. 2014.
 2230 **Retrospective epidemiological analysis of sparganosis in mainland**
 2231 **China 1959 to 2012.** *Epidemiol. Infect.* 142, 2654-2661.
- 2232 LUO A., LING C., HO S.Y.W., ZHU C.D. 2018. **Comparison of methods for**
 2233 **molecular species delimitation across a range of speciation scenarios.**
 2234 *Syst. Biol.* 67(5):830-846.
- 2235 LUTZ A. O. 1919. **Schistosomum mansonii e a Schistosomatose segundo**
 2236 **observações, feitas no Brasil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1919;11(1):121-
 2237 155.
- 2238 MACIEL P., HADDAD C.M. 1968. **Esparganose: primeiro caso no Brasil (nota**
 2239 **prévia).** *Rev. Paul. Med.* 72:270.
- 2240 MARQUES S.M.T., SCISLESKI M.S.O., SOUZA A.L., MURARI C.R. 2019.
 2241 ***Spirometra mansonoides* (Cestoda: Diphylobothriidae) nas fezes de**
 2242 **felídeos atendidos em Porto Alegre/RS - Um parasito negligenciado.**
 2243 *Pubvet* vol 13, n. 4, a311, p.1-4.
- 2244 MENTZ M.B., PROCIANOV F., MAESTRI M.K., ROTT M.B. 2011. **Case report:**
 2245 **Human Ocular Sparganosis in southern Brazil.** *Rev. Inst. Med. Trop. Sao*
 2246 *Paulo*, 53(1): 51-53.

- 2247 MORALES A., LAIRD-PEREZ R.M., CAPO V., IGLESIAS E., FONTE L.,
2248 PLASCENCIA-HERNANDEZ A., CALDERON E.J., EOM K.S., DE ARMAS Y.,
2249 PEREZ-GOMEZ H.R. 2022. **Genetic and morphological identification of**
2250 ***Spirometra decipiens* in Snakes and Domestic dog found in Cuba.**
2251 *Pathogens* 11:1468.
- 2252 MUELLER J. F., FROES O.M., FERNANDEZ T.F. 1975. **On the occurrence of**
2253 ***Spirometra mansonoides* in South America.** *The Journal of Parasitology*,
2254 *vol 61, n 4, 774-775.*
- 2255 NATH T.C., EOM K.S., CHOE S., HM S., ISLAM S., NDOSI B.A., KANG Y., BIA
2256 M.M., KIM S., EAMUDOKARN C., JEON H.K., PARK H., LEE D. 2021.
2257 **Insight into One Health Approach: Endoparasite infections in captive**
2258 **wildlife in Bangladesh.** *Pathogens* 10:250.
- 2259 NATH R., GOGOI R.N. 2015. **Ocular sparganosis from Assam.** *Tropical*
2260 *Parasitology* Vol 5, issue 1.
- 2261 NDOSI B.A., PARK H., LEE D., CHOEpons S., KANG Y., NATH T.C., BIA M.M.B.,
2262 EAMUDOMKARN C., JEON H.K., EOM K.S. 2020. **Morphological and**
2263 **Molecular identification of *Spirometra* tapeworms (Cestoda:**
2264 ***Diphyllbothriidae*) from Carnivorous mammals in the Serengeti and**
2265 **Selous Ecosystems of Tanzania.** *Korean J. Parasitol*, v 58, n 6: 653-660.
- 2266 NEI M.; KUMAR S. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** *Oxford*
2267 *University Pres, New York.*
- 2268 NELLI S., FELIX D., MARINE A. 2014. **Seven new species of helminths for**
2269 **reptiles from Armenia.** *Acta Parasitologica*, 59(3), 442-447.
- 2270 OPUNI E.K. & MULLER R.L. 1974. **Studies on *Spirometra theileri* (Baer, 1925)**
2271 **n. Comb. 1. Identification and biology in the laboratory.** *Journal of*
2272 *Helminthology* 48, 15-23.
- 2273 OPUNI E.K. & MULLER R.L. 1975. **Studies on *Spirometra theileri* (Baer, 1925)**
2274 **n. Comb. 2. Pathology of experimental plerocercoid infections.** *Journal of*
2275 *Helminthology* 49, 121-127.
- 2276 PAMPIGLIONE S., FIORAVANTI M.L., RIVASI F. 2003. **Human Sparganosis in**
2277 **Italy. Case report and review of the European cases.** *APMIS* 111: 349-54.
- 2278 PEGORINI, P.L.; SOUZA, V.K.; PEREIRA, A.P. 2005. ***Trichinella spiralis*.**
2279 *Higiene Alimentar*, v.29, n.135.
- 2280 PETRIGH R.S., SCIOSCIA N.P., DENEGRI G.M., FUGASSA M.H. 2015. **Cox-1**
2281 **gene sequence of *Spirometra* in Pampas foxes from Argentina.**
2282 *Helminthologia*, 52, 4: 355-359.
- 2283 PRATA, L.F. 1999. **Manual de enfermidades transmitidas por alimentos.**
2284 *Jaboticabal: FUNEP.*
- 2285 PUILLANDRE N., LAMBERT A., BROUILLET S., ACHAZ G. 2012. **ABGD,**
2286 **Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation.**
2287 *Molecular Ecology* 21, 1864-1877.
2288
- 2289 PUILLANDRE N., BROUILLET S., ACHAZ G. 2021. **ASAP: aassemble species by**
2290 **automatic patitioning.** *Mol Ecol Resour.*21:609-620.

- 2291
2292 RANNALA B, YANG Z. Species Delimitation. 2020. **Phylogenetics in the**
2293 **genomic era**. Cap. 5.5 Species Delimitation pp 5.5:1-18.
2294
- 2295 RAMOS D.G.S., SCHEREMETA R.G.A.C., OLIVEIRA A.C.S., SINKOC A.L.,
2296 PACHECO R.C. 2013. **Survey of helminth parasites of cats from the**
2297 **metropolitan area of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil**. *Rev. Bras. Parasitol.*
2298 *Vet., Jaboticabal*, v. 22, n.2, p. 201-206.
- 2299 REGO A.A., SCHAFFER G.V. 1992. **Sparganum in some Brazilian vertebrates.**
2300 **Problems in the identification of species of Luheella (*Spirometra*).** *Mem.*
2301 *Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 87, Suppl I, 213-216.
- 2302 RICHARD R.L., ITHOI I., MAJID M.A.A., SULAIMAN W.Y.W., TAN T.C.,
2303 NISSAPATORN V., LIM Y.A.L. 2016. **Monitoring of Waterborne Parasites**
2304 **in Two Drinking Water Treatment Plants: A Study in Sarawak, Malaysia.**
2305 *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13, 641.
- 2306 PONS J., BARRACLOUGH T.G., GOMEZ-ZURITA J., CARDOSO A., DURAN
2307 D.P., HAZELL S., KAMOUN S., SUMLIN W.D., VOGLER A.P. 2006.
2308 **Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of**
2309 **Undescribed Insects.** *Syst. Biol.* 55(4): 595-609.
- 2310 POTT, A., 1988. **Pastagens no Pantanal.** Corumbá: EMBRAPA- CPAP. 58 p.
2311 *Documentos*, no. 7.
- 2312 RANALLA B. 2015. **The art and science of species delimitation.** *Current*
2313 *Zoology*. 61(5): 846-853.
- 2314 RIBICICH, M., GAMBLE, H.R., ROSA, A., BOLPE, J., FRANCO, A. 2005.
2315 **Trichinellosis in Argentina: an historical review.** *Vet Parasitol*, 132 (1-2):
2316 137-142.
- 2317 RUAS J.L. 2007. **Caracterização da fauna parasitária do Pseudalopex**
2318 **gymnocercus (graxaim-do-campo) e do Cerdocyon thous (graxaim-do-**
2319 **mato) na região sul do Rio Grande do Sul.** *Acta Scientiaen Veterinarie*.
2320 35(2): 257-258.
- 2321 RUBTSOVA N.Y. & HECKMANN R.A. 2020. **Morphological features and**
2322 **structural analysis of plerocercoids of *Spirometra erinaceieuropaei***
2323 **(Cestoda: Diphyllbothriidae) from European Pine Marten, *Martes martes***
2324 **(Mammalia: Mustelidae) in Ukraine.** *Comp. Parasitol.* 87(1), pp 109-117.
- 2325 SABU L., LAKSHMANAN B., DEVADA K., KUMAR P.S. 2014. **Occurrence of**
2326 **human sparganosis in Kerala.** *J Parasi Dis.*, v.39(4), 777-779.
- 2327 SAHOO N., SAHOO S., MOHANTY B., KHUNTIA H.K., BEHERA B.K., HOTA
2328 S.R. 2018. **Molecular identification of *Spirometra erinaceieuropaei***
2329 **infection in a dog with its successful treatment.** *Journal of Entomology*
2330 *and Zoology Studies*, 6(4): 1487-1489.
- 2331 SAMBROOK J., RUSSELL D. 2001. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**
2332 **(3rd ed.)** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, 2344 pp., set.
- 2333 SANTOS J.D.O. 2013. **Diversidade de helmintos intestinais em cães**
2334 **domésticos (*Canis familiares* Linnaeus, 1758) e de raposas (*Cerdocyon***

- 2335 **thous Linnaeus, 1766) no semiárido do Nordeste do Brasil e implicações**
 2336 **para a saúde. Dissertação - FIOCRUZ.**
- 2337 SANTOS, J.M.G.; BARROS, M.C.R.B. 2009. **Endoparasitas de importância no**
 2338 **comércio da carne. Revista do Agronegócio e Meio Ambiente, v.2, n.1, p.21-**
 2339 **39.**
- 2340 SAKAMOTO T., GUTIERREZ C., RODRIGUEZ A., SANTO S. 2003. **Testicular**
 2341 **sparganosis in a child from Uruguay. Acta Tropica 88, 83-86.**
- 2342 SCHOLZ T., KUCHTA R., BRABEC J. 2019. **Broad Tapeworms**
 2343 **(Diphyllobothriidae), Parasites of Wildlife and humans: Recent Progress**
 2344 **and Future Challenges. IJP: Parasites and Wildlife 9 (2019) 359-369.**
 2345
- 2346 SCIOSCIA N.P., PETRIGH R.S., BELDOMENICO P.M., DENEGRI G.M. 2014.
 2347 **The Pampas fox (Lycalopex gymnocercus) as new definite host for**
 2348 **Spirometra erinacei (Cestoda: Dyphyllobotriidae). Acta Tropica 133, 78-**
 2349 **82.**
- 2350 SHEATHER AL. 1923. **The detection of intestinal protozoa and mange**
 2351 **parasites by a floatation technique. J Comp Pathol Ther. 36:266–275.**
- 2352 SHIRAKAWA, K., YAMASAKI, H., ITO, A., MIYAJIMA, H. 2010. **Cerebral**
 2353 **sparganosis: the wander inglesion. Neurology 74, 180.**
- 2354 SIANTO L., SOUZA M.V., CHAME M., LUZ M. F., GUIDON N., PESSIS A.M.,
 2355 ARAÚJO A. 2014. **Helminths in feline coprolites up to 9000 years in the**
 2356 **Brazilian Northeast. Parasitology International 63, 851-857.**
- 2357 SILES-LUCAS M., HEMPHILL A. 2002. **Cestode Parasites: Application of In**
 2358 **Vivo and In Vitro Models for Studies on the Host-Parasite Relationship.**
 2359 **Advances In Parasitology Vol 51 (p186-192).**
- 2360 SILVA M.P., MAURO R., MOURÃO G., COUTINHO M. 2000. **Vegetação do**
 2361 **Pantanal através de levantamento aéreo. Revta brasil. Bot., São Paulo,**
 2362 **V.23, n.2, p.143-152, jun. 2000.**
- 2363 SILVA P., DASANAYAKE T., JAYASEKARA D., DHARMARATHNE C.,
 2364 MAHAULPATHA D. 2022. **First record of Spirometra erinaceieuropaei**
 2365 **spargana infection in amphibians of South Asia: A causative agent of**
 2366 **surgical abnormalities. Iran J Parasitol: Vol. 17, N. 3, Jul-Sep 2022, pp.402-**
 2367 **409.**
- 2368 SIMPSON C., JABBAR A., MANSFIELD C.S., TYRREL D., CROSER E.,
 2369 ABRAHAM L.A., GASSER R.B. 2012. **Molecular diagnosis of sparganosis**
 2370 **associated with pneumothorax in a dog. Molecular and Cellular Probes 26,**
 2371 **60-62.**
- 2372 SOBOCINSKA M.K., MINIUK M., RACZYŃSKA I., TOKARSKA M. 2016.
 2373 **Sparganosis in wild boar (Sus scrofa) - Implications for veterinarians,**
 2374 **hunted, and consumers. Veterinary Parasitology 227, 115-117.**
- 2375 SOLOVYEVA E.N., DUNAYEV E.A., NAZAROV R.A., BONDARENKO D.A.,
 2376 POYARKOV N.A. 2023. **COI-Barcoding and species Delimitation**
 2377 **Assessment of Toad-Headed Agamas of the Genus Phrynocephalus**
 2378 **(Agamidae, Squamata) Reveal Unrecognized Diversity in Central**
 2379 **Eurasia. Diversity, 15, 149.**

- 2380 SONG E.J, SOHN Y.M., RYU K.N., MIN S.Y., SHIN S.H., PARK Y.K. 2015.
2381 **Breast sparganosis and incidentally detected subcutaneous and**
2382 **intramuscular sparganosis at several sites: case report and literature**
2383 **review.** *Jpn J Radiol.*, 33(4), 335-228.
- 2384 SORIANO, B.M.A., GALDINO, S. 2002. **Análise da distribuição da frequência**
2385 **mensal de precipitação para a Sub-região de Nhecolândia, Pantanal,**
2386 **Mato Grosso do Sul, Brasil.** *EMBRAPA – Boletim de Pesquisa*
2387 *eDesenvolvimento*, nº 34, 22p.
- 2388 SPADA E., PROVERBIO D., PEPA A.D., DOMENICHINI G., GIORGI B.G.,
2389 TRALDI G., FERRO E. 2013. **Prevalence of faecal-borne parasites in**
2390 **colony stray cats in northern Italy.** *Journal of Feline Medicine and Surgery*
2391 *15(8) 672-677.*
- 2392 TAMURA K., STECHER G., KUMAR S. 2021.**Mega 11: Molecular Evolutionary**
2393 **Genetics Analysis Version 11.** *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 38,
2394 *Issue 7, Pg 3022-3027.*
- 2395 TOLEDO F.A.O, ALVES P.V., VASCONCELOS I.M.A., OLIVEIRA A.R., SANTOS
2396 D.O., CABRAL J.A.G., TOLEDO R.A.R., PINTO H.A., CUNHA P.H.H., LEME
2397 F.O.P., CARVALHO M.P.N., PAIXÃO T.A., SANTOS R.L. 2022.
2398 **Parasitologic and pathologic study of free-ranging South American**
2399 **Rattlesnakes (Crotalus Durissus terrificus) in Brazil.** *Journal of Zoo and*
2400 *Wildlife Medicine 53(3): 515-527.*
- 2401 UGARTE C.E., THOMAS D.G., GASSER R.B., HU M., SCOTT I., COLLET M.G.
2402 2005. ***Spirometra erinacei* / *S. Erinaceiuropaei* in a feral cat in Manawatu**
2403 **with chronic intermittent diarrhoea.** *New Zeland Veterinary Journal*, 53(5),
2404 347-351.
- 2405 URIBE M., PAYAN E., BRABEC J., VELEZ J., TAUBERT A., GUTIERREZ J.J.C.,
2406 HERMOSILLA C. 2021. **Intestinal parasites of neotropical wild Jaguars,**
2407 **Pumas, Ocelots, and Jaguarundis in Colombia: Old friends brought back**
2408 **from Oblivion and New Insights.** *Pathogens 10:822.*
- 2409 VEROCAI G.G., HARVEY T.V., SOBOTYK C., SIU R.E., KULPA M., CONNOLLY
2410 M. 2023. ***Spirometra* infection in a captive Samar cobra (*Naja***
2411 ***samarensis*) in the United States: an imported case?** *International Journal*
2412 *for Parasitology: Parasites and Wildlife 20, 133-137*
- 2413 VIEIRA, F.M. 2011. **Helmintos parasitos de mamíferos carnívoros silvestres**
2414 **no município de Juiz de Fora, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais,**
2415 **Brasil.** *Tese de doutorado - UFRRJ.*
- 2416 VIZCAYCHIPI K.A., RINAS M., IRAZU L., MIYAGI A., ARGÜELLES C.,
2417 DEMATTEO K.E. 2016. **Neotropical Zoonotic Parasites in Bush Dogs**
2418 **(*Speothos venaticus*) from Upper Paraná Atlantic Forests in Misiones,**
2419 **Argentina.** *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(10), 664-672.
- 2420 WAESCHENBACH A., BARBE J., SCHOLZ T., LITTLEWOOD D. T. J., KUCHTA
2421 R. 2017. **The Catholic taste of broad tapeworms - multiple routes do**
2422 **human infection.** *International Journal for Parasitology: 47, 831-843.*
2423

- 2424 WANG H., TANG Y., YANG Y. 2012. **A case of *Spirometra mansonii* infection**
 2425 **with both plerocercoid larvae and adult worm.** *Zhongguo Ji Sheng Chong*
 2426 *Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 30(1): 40.
- 2427 WANG F., LI W., HUA L., GONG S., XIAO J., HOU F., GE Y., YANG G. 2014.
 2428 ***Spirometra* (Pseudophyllidea, Diphyllbothriidae) Severely Infecting**
 2429 **Wild-Caught Snakes from Food Markets in Guangzhou and Shenzhen,**
 2430 **Guangdong, China: Implications for Public Health.** *The Scientific World*
 2431 *Journal*, vol 2014.
- 2432 WIWANITKIT V. 2005. **A review of human sparganosis in Thailand.**
 2433 *International Journal of Infectious Diseases* 9, 312-316.
- 2434 YAMASAKI H., SANPOOL O., RODPAI R., SADAOW L., LAUMMAUNWAI P., UN
 2435 M., THANCHOMMANG T., LAYMANIVONG S., AUNG W.P.P., INTAPAN
 2436 P.M., MALEEWONG W. 2021. ***Spirometra* species from Asia: Genetic**
 2437 **diversity and taxonomic challenges.** *Parasitology International* 80, 102181.
- 2438 YAMASAKI H., SUGIYAMA H., MORISHIMA Y., KOBAYASHI H. 2024.
 2439 **Description of *Spirometra asiana* sp. Nov. (Cestoid: Diphyllbothriidae)**
 2440 **found in wild boar and hound dogs in Japan.** *Parasitology International*
 2441 v.98:102798.
- 2442 YAMASAKI H., SUGIYAMA H., MORISHIMA Y., SAKO Y. 2024. **Molecular**
 2443 **identification of *Spirometra* infections in companion animals and wildlife**
 2444 **in Japan.** *J Vet Med Sci* 86(4): 409-412.
- 2445
 2446 YANG Y., WEN Y.J., CAI Y.N., VALLEE I., BOIREAU P., LIU M.Y., CHENG S.P.
 2447 2015. **Serine proteases of parasitic helminths.** *Korean J. Parasitol*, v 53, n
 2448 1:1-11.
- 2449 YUDHANA A., PRAJA R.N., SUPRIMENTO A. 2019. **The medical relevance of**
 2450 ***Spirometra* tapeworm infection in Indonesian Bronzeback snakes**
 2451 **(*Dendrelaphis pictus*): a neglected zoonotic disease.** *Veterinary World*,
 2452 12(6): 844-848.
- 2453 YUDHANA A., PRAJA R.N., YUNITA M.N., WARDHANA D.K. 2020. **Molecular**
 2454 **Evidence of *Spirometra erinaceieuropaei* in Asian Wild Frogs (*Rana***
 2455 ***rugulosa*) from Banyuwangi City, Indonesia.** *World Vet J.*, 10(2): 170-174.
- 2456 YUDHANA A., PRAJA R.N., KARTIKASARI A.M. 2021. **Sparganosis**
 2457 **(*Spirometra*) in Asian water monitor (*Varanus salvator*): A medical**
 2458 **implication for veterinarians, breeders, and consumers.** *Veterinary World*,
 2459 14(9): 2482-2487.
- 2460 ZHANG J., KAPLI P., PAVLIDIS P., STAMATAKIS A. 2013. **A general species**
 2461 **delimitation method with applications to phylogenetic placements.** 2013.
 2462 *Bioinformatics* Vol. 29 n. 22, pg 2869-2876.
- 2463 ZHANG X., CUI J., LIU L.N., WEI T., JIANG P., WANG Z.Q. 2014. **Phylogenetic**
 2464 **location of the *Spirometra* Sparganum isolates from China, based on**
 2465 **sequence of 28S rDNA D1.** *Iranian J Parasitol: Vol* 9, n 3, 319-328.
- 2466 ZHANG X., WANG H., CUI J., JIANG P., FU G.M., ZHONG K., ZHANG Z.F.,
 2467 WANG Z.Q. 2015(a). **Characterisation of the relationship between**
 2468 ***Spirometra erinaceieuropaei* and *Diphyllbothrium* species using**
 2469 **complete *cytb* and *cox1* genes.** *Infection, Genetics and Evolution* 35, 1-8.

- 2470 ZHANG T.W., CUI J., LIU L.N., JIANG P., WANG Z.Q. 2015(b). **Levels of**
2471 **sparganum infections and phylogenetic analysis of the tapeworm**
2472 ***Spirometra* erinaceieuropaei sparganum in wild frogs from Henan**
2473 **Province in central China.** *Journal of Helminthology*, 89, 433-438.
- 2474 ZUO J., FENG H.G., XIE S.S., YANG J.T. 2018. **A case of mammary**
2475 **sparganosis due to infection with *Spirometra* mansoni.** *Breast J.*, 25:712-
2476 715.
- 2477

ANEXOS

2478

2479

2480

Quadro 1: Compilado de relatos de ocorrência de esparganos, hospedeiros, local de ocorrência e prevalência (quando descrita).

Local	Hospedeiro	Prevalência
Espanha (Importado Ilhas Maurício) Polônia	Macacos (<i>Macaca fascicularis</i>)	
	Javalis (<i>Sus scrofa</i>)	
	Cão-guaxinim (<i>Nyctereutes procyonoides</i>), Texugo Europeu (<i>Meles meles</i>), Marta (<i>Martes martes</i>), Fuinha (<i>Martes foina</i>), Furão (<i>Mustela putorius</i>), Vison (<i>Neovison vison</i>) e o Lince (<i>Lynx lynx</i>)	29,5%
Tanzânia	Javali Africano do Deserto (<i>Phacochoerus aethiopicus</i>)	
China	Sapos (<i>Rana limnocharis</i> e <i>Rana nigromaculata</i> , <i>R. Rugulosa</i> , <i>R. temporaria</i>)	3,2 a 90%
	Cobras (<i>Ptyas dhumnades</i> , <i>Elaphe carinata</i> , <i>Elaphe taeniura</i> , <i>Elaphe quadrivirgata</i> , <i>Enhydris chinensis</i> , <i>Dinodon rufozonatum rufozonatum</i> , <i>Elaphe schrenkii</i> , <i>Agkistrodon saxatilis</i>)	
	Cobras <i>Deinagkistrodon acutus</i> (60%), <i>Bungarus multicinctus</i> (7,7%), <i>Naja atra</i> (14,3%), <i>Dinodon rufozonatum</i> (79,5%), <i>Elaphe carinata</i> (63,6%), <i>E. taeniura</i> (15,4%), <i>Ptyas korros</i> (40%), <i>P. mucosus</i> (81,6%), <i>Xenochophis piscator</i> (79,4%), <i>Zoacys dhumnades</i> (96,2%).	55% (amostradas em mercado de alimentos)
	<i>Rana tigrina rugulosa</i> e <i>R. limnocharis</i>	11,8%
Coreia	<i>Rhabdophis tigrinus tigrinus</i> , <i>Dinodon rufozonatum rufozonatum</i> , <i>Elaphe davidi</i> , <i>Elaphe schrenkii</i> , <i>Agkistrodon saxatilis</i>)	
Japão	Cobras (<i>Ptyas dhumnades</i> , <i>Elaphe carinata</i> , <i>Elaphe taeniura</i> , <i>Elaphe quadrivirgata</i> , <i>Enhydris chinensis</i>)	
Myanmar	Sapos (<i>Rana rugulosa</i> , <i>R. tigrina</i> , <i>Hoplobatrachus rugulosus</i>)	
Sri Lanka	Sapos (<i>Truga eques</i> , <i>Minverya agrícola</i>)	37,5%
Armênia	Cobras (<i>Natrix tessellata</i> e <i>Macrovipera lebetina</i>)	
Índia	Cobras “russell`s black viper”	
Austrália	Raposas (<i>Vulpes vulpes</i>)	
	Sapos (<i>Litoria gracilentia</i> , <i>L. peronii</i> , <i>L. aurea</i> e <i>L. Caerulea</i>)	4,9%
Colômbia	Cachorro-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	
Ucrânia	Martas (<i>Martes martes</i>)	36,8%
Guam	Cobras (<i>Boiga irregularis</i>)	77,5%
Indonésia	Cobras (<i>Dendrelaphis pictus</i>)	50,85% (mercado de alimentos)
	Lagartos (<i>Varanus salvator</i>)	69,64% (mercado de alimentos)

Sapos (*Rana rugulosa*)9,1%
(mercado
de
alimentos)

Laos
Tailândia
Cuba

Estados Unidos
(importado
Filipinas)
Brasil

Cobra (*Ptyas korros*)
Cobra (*Ptyas korros*)
Cobras (*Chilabothrus angulifer*, *Cubophis
cantherigeus*)
Cobra (*Naja samarensis*)

Anfíbios (*Bufo sp.*, *Bufo crucifer*, *Leptodactylus
ocellatus*, *Hyla faber*, *Dermatonotus muelleri*, *Ameiva
ameiva*)

Répteis (*Herpetodryas carinatus*, *H. fuscus*, *Ameiva
ameiva*, *Bothrops sp.*, *Pseudalopex gymnocercus*,
Drymarchon corais, *Crotalus durissus*, *Dryadophia
bifossatus*)

*Crotalus
durissus* 2%

Cuíca (*Phylander opossum*)

Graxaim do campo (*Pseudalopex gymnocercus*)

2481 Fonte: OPUNI e MULLER, 1974; OPUNI; MULLER, 1975; GOMES, 1984; FORTES e
2482 HOFFMANN, 1987; HATSUSHIKA e OKINO, 1987; REGO e SCHAFFER, 1992; BERGER et al.,
2483 2009; LI et al., 2011; BEZERRA et al., 2012; KAVITHA et al., 2013; BAUCHET et al., 2013;
2484 JONGTHAWIN et al., 2014; NELLI et al., 2014; ZHANG et al., 2014; WANG et al., 2014;
2485 HOLLDORF et al., 2015; JEON et al., 2015; LIU et al., 2015a; ZHANG et al., 2015b; ALMEIDA et
2486 al., 2016; HONG et al., 2016; JEON et al., 2016b SOBOCINSKA et al., 2016, JEON et al., 2018b;
2487 YUDHANA et al., 2019; RUBTSOVA e HECKMANN, 2020; KONDZIOR et al., 2020; YUDHANA et
2488 al., 2020, YUDHANA et al., 2021; CHEN et al., 2022; SILVA et al., 2022 e TOLEDO et al., 2022.
2489

2490 **Quadro 2:** Compilado de relatos de ocorrência de formas adultas de *Spirometra* sp., hospedeiros,
2491 local de ocorrência e prevalência (quando descrita).

Local	Hospedeiro	Prevalência
China	Tigre (<i>Panthera tigris</i>), o Gato-de-bengala (<i>Prionailurus bengalensis</i>), e Gato selvagem (<i>Felis silvestris</i>)	
Japão	Cães e gatos Raposas (<i>Vulpes vulpes schrencki</i>) Cães e gatos (ovos nas fezes)	19% a 40,5%
Coreia	Gato	
Índia	Cão	
Bangladesh	Leão (<i>P. leo</i>) e Civeta (<i>Civettictis civetta</i>) (ovos nas fezes)	
Irã	Gato selvagem (<i>Felis silvestris</i>)	
Grand Cayman	Gatos	18,18%
Tanzânia	Leopardo (<i>Panthera pardus</i>), Hiena (<i>Crocuta crocuta</i>), Leões (<i>Panthera leo</i>) (ovos nas fezes e parasita adulto)	
Itália	Gato (ovos nas fezes)	1,4%
Argentina	Graxains-do-campo (<i>Lycalopex gymnocercus</i>) Cachorro-vinagre (<i>Speothos venaticus</i>) (ovos nas fezes)	15,4%
Cuba	Cão	
Brasil	Gatos (ovos nas fezes) - Porto Alegre Gatos (ovos nas fezes) - Pelotas Gatos (ovos nas fezes) - Cuiabá Graxains-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>) e Graxains-do-campo (<i>Pseudalopex gymnocercus</i>) Gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i>) e Gato-dos-pampas (<i>Leopardus colocolo</i>) (ovos nas fezes) Jaguaririca (<i>Leopardus pardalis</i>) e Raposa-do-campo (<i>Lycalopex vetulus</i>) (ovos e proglótides nas fezes) <i>C. thous</i>	4,11% 61,11% E 54,55% 9,46% a 30%
Equador	Lobos guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	10%
Colômbia	Gatos (ovos nas fezes) Gatos (ovos nas fezes) Jaguars (<i>Panthera onca</i>) e Jaguariricas (<i>Leopardus pardalis</i>) (ovos nas fezes)	36%
Estados Unidos	Gatos (ovos nas fezes)	
Bolívia	Gato-do-mato (<i>Oncifelis geoffroyi</i>) Jaguariricas (<i>Leopardus pardalis</i>) (ovos nas fezes)	

2492 Fonte: MUELLER et al., 1975; FIORELLO et al., 2006; RUAS, 2007; CURI et al., 2010; VIEIRA,
2493 2011; HEADLEY et al., 2012; LESCANO e ZUNT, 2013; RAMOS et al., 2013; SANTOS, 2013;
2494 SPADA et al., 2013; SCIOSCIA et al., 2014; PETRIGH et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016;
2495 GRESSLER et al., 2016; HONG et al., 2016; VIZCAYCHIPI et al., 2016; BADRI et al., 2017; EOM
2496 et al., 2018; JEON et al., 2018a; SAHOO et al., 2018; EOM et al., 2019; MARQUES et al., 2019;
2497 FERRAZ et al., 2020; NDOSI et al., 2020; KIM et al., 2021; NATH et al., 2021; URIBE et al., 2021 e
2498 CHEN et al., 2022.

Quadro 3: Caracteres taxonômicos comparativos entre as espécies de *Spirometra* sp.. disponíveis na literatura.

Caracteres	<i>S. erinaceieuropaei</i>	<i>S. decipiens</i>	<i>S. mansonii</i>	<i>S. theileri</i>	<i>S. mansonoides</i>	<i>S. ranarum</i>	<i>S. asiana</i>
Comprimento	estrobila: 68 cm; 45cm; 7-33cm; 26-45cm	estróbila: 47 cm; 41cm	entre 12 e 14 cm	45cm; 134cm	estróbila máximo 60cm	75cm; 237 cm	2,43 – 2,55m
Largura	6,8-10,8 mm	3,1-4,2 mm	3 mm largura e 0,3 mm de espessura.	largura máxima 3mm	largura máxima 7mm	3 a 5 mm	5-8mm
Escólice	espatulado; 0,2 mm de diâmetro por 1,0 mm de comprimento; 2 sulcos longitudinais (bótrias), se projetado como espátula ventral e dorsal; formato de colher, 0,4mm diâmetro, 1mm comprimento	0,5 mm de diâmetro por 1,5 mm de comprimento; espatulado 0,2 mm diâmetro x 1,5mm comprimento. Pescoço 1 cm; 2,74 +- 0,43 x 0,73 +- 0,11mm; formato de colher c/ 2 botrias 0,5 x 1,5mm	*	*	delicado, pouco destacado do pescoço. Seção transversal do escólice retangular, largura superior à altura. Bótria rasa, de fundo largo e plano, contínua com a superfície do pescoço	1.4-1.7 mm de comprimento x 0,37-0,41 mm de largura	0.2-1.03mm
Proglótide	Imatura: 0,43x1,97,	grávida: 0,5- 0,9 x 0,1-0,2	*	*	*	12 x 3 mm; grávida: 15 x	Grávida: 1,6- 1,7 x 4,2-

	madura: 0.86x2,77, grávida: 2,18x4.46mm; 7mm largura x 2- 3mm comprimento; 5-9mm largura x 5-8mm comprimento, ficando mais larga nos segmentos terminais; 6,8- 10,8 x 1,1-2mm	mm; 4,2 +- 0,03 x 1,7 +- 0,01 mm; 1,6- 2 x 4,0-4,3 mm; 3,1-4,2 x 2,1-3,2mm				2 mm; 2,5 x 12 mm	4,6mm, 5,5-7 x 5-6mm
Musculaturas	*	*	transversais	bem desenvolvida	externa aos testículos, uma camada de feixes musculares longitudinais	*	*
Corpúsculos de calcário	*	*	corpos ovais e planos, com diâmetro médio de cerca de 0,25 mm	encontrados em todo o parênquima	*	*	*
Testículos	70-80 µm de diâmetro. Vesicula seminal:	70-80 µm de diâmetro. Vesicula	na margem anterior do segmento	muito numerosos, em uma	numerosos, esféricos, em campos	em dois grupos, 100- 110 em cada	Média de 512 testículos por proglótide

	elíptica, 200-250x100-150 µm; numerosos, localizados nas camadas dorsal e ventral; se estendem da margem lateral do útero até a porção anterior	seminal: 240-280 x 100-150 µm; 71,4 +- 0,7cm diâmetro		única camada formando 2 campos laterais unidos por uma única linha de testículos, na parte anterior do segmento; diâmetro 0,06mm	laterais	um, não unidos por uma banda anterior; 74 µm de diâmetro	grávida, 127 x 99.9 µm; formato oval ou folicular; formando uma camada unica.
Vagina	2,0-2,5 cm (tratada como primórdio genital); separada do cirro e próxima ao poro uterino	2,5-3,0 cm (tratada como primórdio genital); formato de lua crescente, próxima ao cirro	Próximo às bobinas anteriores do útero	se abre atrás da bolsa do cirro, na parte inferior de um átrio bastante profundo; sua parte distal está expandida para formar um receptáculo seminal; atras do poro genital	curva-se ventralmente sobre a superfície da massa uterina	ligeiramente lateral ao poro genital; poro genital e vaginal localizados ventralmente no terço médio anterior da proglótide	se inicia no átrio genital indo até a porção ventral do útero.

Ovário	em forma de haltere, conectado ao útero e situado próximo à margem posterior do segmento; localizado na margem posterior do útero.	em forma de haltere e conectado ao útero e situado próximo à margem posterior do segmento	*	Localizado dorsalmente. formato de haltere, próximo à margem posterior da proglótide, conectado ao útero	uma banda ventral achatada, com asas reticuladas	ramificado e conectado ao útero, situado à margem posterior da proglótide	658,1 x 1354,1 µm; bi-lobado e espiral, na margem posterior da proglótide. Glândula de mehlis situada no meio de cada lobo ovariano.
Útero	Consiste em 5-7 alças de cada lado; conspícuo, no centro, com formato espiral formato de S, c/ 5-7 alças; alça uterina anterior e posterior na linha mediana da proglótide; 7-8 espirais completos; espiral anterior e posterior na linha média longitudinal da proglótide.	consiste em 4-4,5 alças de cada lado; espiralado, formato de bola no final. A bola mede 457,7 +- 4,8 µm de diâmetro. 3-4 voltas espirais; consiste de espirais pressionados.	consiste em 4,5 voltas que são frouxamente espiraladas e, além disso, uma pilha interna (mais distal) claramente separada da pilha externa	é caracterizado pelo seu grande diâmetro na linha média; 3-4,5 voltas	útero de duas seções, uma série posterior de bobinas estreitas e uma série anterior de bobinas alargadas. Bobinas posteriores com paredes finas; formato de "C", c/ 2 voltas, contraída na linha média p/ formar câmara de expulsão	3-3,5 voltas c/ formato de gravata borboleta e adota direção diagonal após a segunda volta	5-6 voltas

					lateral.		
Poro uterino	linha média atrás da margem anterior da esfera terminal, 80-100 µm; no terço médio ventral da proglótide grávida; central; no terço médio ventral da proglótide posterior a vagina, atrás da margem anterior da bola uterina, c/ 75-105µm	linha média atrás da margem anterior da bola terminal, 80-110 µm; linha média c/ esfíncter notável, em posição ventral sob a protuberância da parte terminal do útero; linha média ventral, posterior ao poro vaginal.	encontra-se no ventrículo médio da bobina anterior	posterior à vagina; linha média atrás da margem anterior da bola, 0,03mm de diâmetro	poro uterino distalmente ao poro vaginal e a borda posterior da proglótide, ligeiramente para um lado da linha mediana	na linha média, atrás da margem anterior da bola uterina c/ diâmetro de 370-420 µm; na linha média atrás da margem anterior da bola uterina c/ diâmetro de 370 µm	na linha média ventral na porcao terminal do útero
Cirro	seções longitudinais da bolsa do cirro mostram estrutura oval, 200-250 µm de comprimento por 120-150 µm de largura; rodeado pela vesícula	200-220 µm por 150-170 µm; muscular e alongado; 260,3 +- 2,6 µm de diâmetro; bolsa do cirro envolve a vesícula	extremamente longo dorso-ventral	Bolsa do cirro ovalada, 0,16 x 0,13 mm. Vesícula seminal é elíptica 0,13 x 0,14 mm	cirro invertido forma uma segunda câmara no saco cirro, os dois se comunicando pelo ducto ejaculatório, que fica	Diâmetro 197-222 µm	Saco do cirro englobando vesícula seminal: 494,7 x 335,9 µm no terço anterior na porcao ventral de cada proglótide;

	seminal e separado da vagina; atrás do poro genital e perto da vagina, projetado em direção ao dueto vaginal; abertura separada da vagina, próximo ao poro uterino, localizado envolto pelo receptáculo seminal	seminal, longo e ovalado c/ 387 x 226 μ m, poro do cirro localizado anterior ao poro vaginal ao longo da linha média ventral no terço anterior da proglótide.			próximo à superfície anterior do saco cirro		abertura separada do poro vaginal;
Poro genital	situado ventralmente na linha média no 1/5 anterior do segmento	situado ventralmente, na linha média no 1/5 anterior do segmento; elíptico e crescente	o poro vaginal é uma abertura transversalmente achatada, imediatamente atrás do poro genital masculino, a alguma distância em frente à bobina uterina terminal	localizado ventralmente na linha média no 1/5 anterior da proglótide	*	quase na margem anterior do segmento, mediana perto do poro vaginal à lateral; ventralmente na linha média, no 1/3 anterior do segmento	abre separadamente do poro do cirro
Ovos	mediram 57-61 μ m por 33-36 μ m;	56-60 μ m por 34-36 μ m;	média de 59 a 66 μ m de	A casa é espessa,	largos; de forma	0,058- 0,067 por 0,034-	média 76,9 x 33,2mm no

	55,2-78,9 (66,6)x 28,9- 44,7(37,1) μm ; operculado, 60x40 μm ; operculado, 57x34 μm ; 66,37x35,75 μm	pontudos, c/ opérculo cônico	comprimento por 32,5 a 35,6 μm de diâmetro transversal	medem 57 x 34 μm ; 54-57 x 20-24 μm	variável, com tendência a extremidades pontiagudas e opérculo cônico	0,036 μm ; 57-60 x 34,2-35,3 μm ; 52-55 x 31-35 μm	útero, 65,9 x 31,6mm em SEM. Elípticos e pontudos nas extremidades, assimétricos, castanho claro, operculado.
--	---	------------------------------------	--	---	---	---	---

Referências: JEON et al., 2015; NDOSI et al., 2020; GASTON & PABLO, 2021; SCIOSCIA et al., 2014; ZHANG et al., 2015b; UGARTE et al., 2005; JEON et al., 2016a; JEON et al., 2015; JEON et al., 2018a; FREDES et al., 2021; JEON et al., 2016a; FAUST et al., 1929. NDOSI et al., 2020; EOM et al., 2019; JEON et al., 2016a; NDOSI et al., 2020; JEON et al., 2018b; EOM et al., 2018; YAMASAKI et al., 2024.

*Informação não encontrada

Quadro 4: Quadro de análise de estimativa das distâncias evolutivas entre as 33 sequencias analisadas.

	Spionetra entraceurupaei MK085920.1	Spionetra entraceurupaei MK085923.1	Spionetra entraceurupaei MK085926.1	Spionetra entraceurupaei MK085933.1	Spionetra entraceurupaei MK085932.1	Spionetra entraceurupaei OAG1841.1.6840- 8415	Spionetra sp. CP093552.1	Spionetra asiatica LC375855.1	Spionetra asiatica LC375854.1	Spionetra asiatica LC375853.1	Spionetra asiatica LC375852.1	Spionetra asiatica LC375851.1	Spionetra marsoni KM099140.2	Spionetra marsoni KM099139.2	Spionetra marsoni KM099138.2	Spionetra marsoni KM099126.2	Spionetra marsoni KM099125.2	Spionetra entraceurupaei MK085882.1	Spionetra entraceurupaei MK085880.1	Spionetra entraceurupaei MK085876.1	Spionetra entraceurupaei MK085872.1	Spionetra entraceurupaei MK085866.1	Spionetra entraceurupaei MK085846.1	Spionetra decipiens MT127462.1	Spionetra decipiens MT127461.1	Spionetra decipiens MW031095.2	Spionetra decipiens MW031094.2	Spionetra theileri MK095901.1	Spionetra theileri NC 566327.1.687- 4.8439	Spionetra ranarum NC031262.1.1- 1555	Spionetra ranarum MN025869.1- 1-1555	Spionetra pantanal BR 3	Spionetra pantanal BR 5			
Spionetra entraceurupaei MK085920.1																																				
Spionetra entraceurupaei MK085923.1	0.006																																			
Spionetra entraceurupaei MK085926.1	0.011	0.010																																		
Spionetra entraceurupaei MK085933.1	0.012	0.016	0.011																																	
Spionetra entraceurupaei MK085932.1	0.000	0.006	0.011	0.012																																
Spionetra entraceurupaei OAG1841.1.6840-8415	0.037	0.030	0.040	0.043	0.037																															
Spionetra sp. CP093552.1	0.067	0.067	0.066	0.065	0.067	0.099																														
Spionetra asiatica LC375855.1	0.105	0.103	0.109	0.110	0.105	0.087	0.127																													
Spionetra asiatica LC375854.1	0.105	0.109	0.109	0.110	0.105	0.087	0.127	0.000																												
Spionetra asiatica LC375853.1	0.105	0.108	0.109	0.110	0.105	0.087	0.127	0.000	0.000																											
Spionetra asiatica LC375852.1	0.105	0.103	0.109	0.110	0.105	0.087	0.127	0.000	0.000	0.000																										
Spionetra asiatica LC375851.1	0.105	0.109	0.109	0.110	0.105	0.087	0.127	0.000	0.000	0.000	0.000																									
Spionetra marsoni KM099140.2	0.034	0.030	0.038	0.040	0.034	0.010	0.054	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091																								
Spionetra marsoni KM099139.2	0.028	0.027	0.033	0.035	0.028	0.027	0.077	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.024																							
Spionetra marsoni KM099138.2	0.036	0.032	0.040	0.042	0.036	0.029	0.056	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.024	0.024																						
Spionetra marsoni KM099126.2	0.036	0.031	0.039	0.042	0.036	0.006	0.056	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.004	0.027	0.004																					
Spionetra marsoni KM099125.2	0.038	0.033	0.041	0.043	0.038	0.012	0.054	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.016	0.023	0.015	0.013																				
Spionetra entraceurupaei MK085882.1	0.011	0.017	0.012	0.007	0.011	0.044	0.067	0.112	0.112	0.112	0.112	0.112	0.041	0.036	0.043	0.043	0.042	0.044																		
Spionetra entraceurupaei MK085880.1	0.008	0.013	0.014	0.014	0.008	0.037	0.068	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105	0.034	0.027	0.036	0.035	0.037	0.012																		
Spionetra entraceurupaei MK085876.1	0.011	0.016	0.011	0.008	0.011	0.044	0.068	0.112	0.112	0.112	0.112	0.112	0.042	0.035	0.043	0.043	0.045	0.001	0.011																	
Spionetra entraceurupaei MK085872.1	0.010	0.012	0.017	0.015	0.010	0.032	0.068	0.102	0.102	0.102	0.102	0.102	0.038	0.023	0.032	0.031	0.032	0.015	0.009	0.014																
Spionetra entraceurupaei MK085866.1	0.019	0.023	0.022	0.020	0.019	0.031	0.095	0.102	0.102	0.102	0.102	0.102	0.027	0.034	0.029	0.028	0.034	0.019	0.019	0.019	0.017															
Spionetra entraceurupaei MK085846.1	0.011	0.015	0.011	0.001	0.011	0.044	0.066	0.109	0.109	0.109	0.109	0.109	0.041	0.034	0.043	0.042	0.044	0.008	0.013	0.007	0.015	0.019														
Spionetra decipiens MT127462.1	0.017	0.019	0.023	0.024	0.017	0.024	0.076	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.027	0.019	0.037	0.027	0.024	0.026	0.025	0.017	0.024	0.011	0.027	0.024												
Spionetra decipiens MT127461.1	0.017	0.019	0.023	0.023	0.017	0.027	0.072	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.029	0.020	0.028	0.026	0.027	0.024	0.018	0.023	0.010	0.026	0.022	0.006												
Spionetra decipiens MW031095.2	0.017	0.017	0.022	0.024	0.017	0.023	0.075	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.026	0.017	0.026	0.023	0.023	0.025	0.017	0.024	0.011	0.027	0.024	0.004	0.006											
Spionetra decipiens MW031094.2	0.017	0.017	0.022	0.024	0.017	0.023	0.076	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095	0.026	0.018	0.026	0.023	0.024	0.025	0.017	0.024	0.011	0.027	0.024	0.004	0.006	0.003										
Spionetra theileri MK095901.1	0.109	0.107	0.111	0.112	0.109	0.096	0.140	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.102	0.098	0.101	0.099	0.096	0.114	0.109	0.115	0.105	0.109	0.113	0.097	0.098	0.095	0.096									
Spionetra theileri NC 566327.1.6874-8439	0.109	0.107	0.111	0.112	0.109	0.096	0.140	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.102	0.098	0.101	0.099	0.096	0.114	0.109	0.115	0.105	0.109	0.113	0.097	0.098	0.095	0.096	0.000								
Spionetra ranarum NC031262.1.1-1555	0.036	0.031	0.039	0.042	0.036	0.005	0.056	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.005	0.027	0.034	0.031	0.013	0.042	0.035	0.043	0.031	0.028	0.042	0.023	0.026	0.022	0.022	0.098	0.098							
Spionetra ranarum MN025869.1.1-1555	0.036	0.031	0.039	0.042	0.036	0.005	0.056	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.005	0.027	0.034	0.031	0.013	0.042	0.035	0.043	0.031	0.028	0.042	0.023	0.026	0.022	0.022	0.098	0.098	0.000						
Spionetra pantanal BR 3	0.193	0.192	0.195	0.197	0.193	0.183	0.223	0.184	0.184	0.184	0.184	0.184	0.186	0.189	0.186	0.184	0.187	0.199	0.193	0.196	0.193	0.199	0.196	0.186	0.188	0.185	0.183	0.168	0.168	0.184	0.184					
Spionetra pantanal BR 5	0.192	0.191	0.194	0.196	0.192	0.182	0.222	0.183	0.183	0.183	0.183	0.183	0.185	0.189	0.185	0.183	0.186	0.198	0.192	0.197	0.192	0.198	0.195	0.185	0.187	0.184	0.182	0.168	0.168	0.183	0.183	0.003				