

DAN JESSÉ GONÇALVES DA MOTA

Infecção natural por larvas de metastrongilídeos em moluscos terrestres de diferentes regiões do estado de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto

SÃO PAULO

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Mota, Dan Jessé Gonçalves da

Infecção natural por larvas de metastrongilídeos em moluscos terrestres de diferentes regiões do estado de São Paulo / Dan Jessé Gonçalves da Mota. – 2018.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisa Laboratorial em Saúde Pública
Orientação: Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto

1. Moluscos. 2. Metastrongyloidea. 3. Angiostrongylus cantonensis.
4. Microscopia. 5. Técnicas de diagnóstico molecular.

SES/CCD/CD-371/2018



"Os mais poderosos intelectos da Terra não podem compreender a Deus. Os homens podem estar sempre a pesquisar, sempre a aprender, e ainda há, para além, um infinito de conhecimento".

Ellen G. White

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ira e Lauro.

Aos meus irmãos Adriana, Damaris, Jonas e Tamine.

A minha esposa Valéria.

Aos meus sobrinhos, Ádila, Júlia, Bruno e Sofia.

Aos cunhados Robson e Felipe.

Obrigado por vocês terem sido em minha vida modelos reais de amor, amizade, apoio, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, pela oportunidade e confiança em mim depositada ao longo desses anos, pela orientação, incentivo e importante participação na minha formação científica.

Ao Programa de Pós - Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade de realização do doutorado. Minha gratidão a todos docentes e colegas de curso que contribuíram com minha formação acadêmica.

Ao Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio e acolhimento muito importantes nesta etapa de minha formação, agradeço a todos os funcionários que de várias maneiras apoiaram a execução deste trabalho.

A pesquisadora e amiga Leyva Cecília Vieira de Melo pelo auxílio e companhia durante as várias fases de execução deste trabalho.

A Dra. Vera Lúcia Pereira- Chiocolla por ter cedido Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos e Fungos para as análises moleculares.

Aos funcionários Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos e Fungos Ricardo Gava e Cristina Meira Strejevitch no auxílio durante as análises de biologia molecular.

A Dra. Susana Angélica Zevallos Lescano e Dr. Ronaldo César Borges Gryscek do Instituto de Medicina Tropical por cederem os roedores para este estudo.

A professora Gianni Santos da Unifesp pelo auxílio e realização das análises estatísticas.

Ao Laboratório de Identificação e Pesquisa em Fauna Sinantrópica – LABFAUNA e Centro de Controle de Zoonoses – CCZ pelo envio de amostras de moluscos e auxílio na elucidação de dois casos suspeitos de meningite eosinofílica o município de São Paulo.

A SUVIS Cidade Tiradentes pela confiança e parceria em estudo de caso suspeito de meningite eosinofílica no município de São Paulo.

Às Secretarias Municipais Vigilância em Saúde de Bauru, Dois Córregos, Ilha Bela, Itaquaquecetuba, Jandira, Mongaguá, Monte Mor, Pindamonhangaba, Pinhalzinho, Rancharia, São Lourenço da Serra, São Paulo, São Vicente, Ubatuba e Vargem Grande Paulista pelo envio de moluscos para análises no Núcleo de Enteroparasitas do Adolfo Lutz.

Aos membros que compuseram as bancas de qualificação e defesa por terem aceitado o convite para participar e contribuir com este trabalho.

A minha esposa Valéria por toda compreensão, paciência e carinho nos momentos em que precisei ficar ausente.

A minha família pelos gestos de amor, dedicação, apoio e nos momentos difíceis dessa caminhada. Obrigado por sempre me incentivarem.

A todos meus amigos agradeço-lhes por todas as manifestações de amizade e incentivo, sem os quais não seria possível essa conquista.

A SUVIS Parelheiros por todo apoio durante os períodos que precisei me ausentar para conclusão deste trabalho.

Àquele (Deus) que é poderoso de realizar infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou imaginamos, de acordo com seu poder que age em nós, meu muito obrigado.

RESUMO

A meningite eosinofílica causada por *Angiostrongylus cantonensis* é transmitida ao homem pela ingestão acidental ou intencional de alimentos contaminados, caracóis e lesmas crus ou hospedeiros paratênicos (camarões de água doce, caranguejos, anfíbios ou lagartos). Na última década, a doença tem assumido caráter emergente no Brasil. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver estudo prospectivo para avaliar a infecção natural por metastrongilídeos de interesse médico e veterinário em moluscos de diferentes áreas em municípios do estado de São Paulo. Neste estudo foram incluídos moluscos recebidos pelo Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz no período de novembro de 2008 a dezembro de 2015 por demanda espontânea ou busca ativa. As espécies identificadas foram distribuídas em nove famílias, 14 gêneros e 15 espécies. Os exames parasitológicos em 4536 moluscos identificaram a infecção por larvas de metastrongilídeos em 36 isolados provenientes dos municípios de Bauru, Itaquaquecetuba, Mongaguá e São Paulo. Doze espécies foram relacionadas como hospedeiras intermediárias: *Achatina fulica*, *Belocaulus willibaldoi*, *Bradybaena similaris*, *Deroceras laeve*, *Leptinaria concentrica*, *Limacus flavus*, *Lamellaxis goodalli*, *Prohappia besckei*, *Phyllocaulis boraceinsis*, *Phyllocaulis variegatus*, *Rumina decollata* e *Sarasinula linguaeformis*. As análises morfométricas das larvas L3 recuperadas dos moluscos, quando comparadas com os isolados de referências de *A.costaricensis* e *A.cantonensis*, indicaram maior similaridade com esta última espécie em 24 isolados. A análise molecular (PCR) identificou 20 isolados como *A.cantonensis*. No município de Bauru foi constatada a infecção por *Aelurostrongylus abstrusus*, metastrongilídeo pulmonar de felinos em *A.fulica*. O mesmo parasita foi encontrado infectando *A.fulica* e *P.boraceinsis* no município de Mongaguá. Em área urbana da zona sul de São Paulo foi constatada a biocenose envolvendo a infecção por *A. cantonensis* em seis espécies de moluscos e em *Rattus norvegicus*. Na zona leste de São Paulo, na residência de um caso humano confirmado laboratorialmente foi encontrado larvas de *A.cantonensis* em fezes de roedor e em três espécies de moluscos. Estas ocorrências levaram a sistematização das ações envolvendo o Laboratório de Saúde Pública e as Vigilâncias, visando à resposta rápida do diagnóstico laboratorial, imediata notificação de casos e a investigação malacológica e de roedores.

Palavras-chave: moluscos, Metastrongyloidea, *Angiostrongylus cantonensis*, microscopia, técnicas de diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* is transmitted to humans either by the accidental or intentional ingestion of contaminated food or snails and raw slugs or paratenic hosts (freshwater prawns, crabs, amphibians or lizards). The disease has reached a critical point in Brazil in the last decade. Thus, the objective of this work was to develop a prospective study to evaluate the natural infection by metstrongylids of medical and veterinary interest in molluscs from different areas in municipalities of the state of São Paulo. We included, in this study, molluscs received by the Enteroparasites Nucleus of Adolfo Lutz Institute from November 2008 to December 2015 by spontaneous demand or active search. The species identified were distributed in nine families, 14 genera and 15 species. Parasitological examinations in 4536 molluscs identified the infection by metastrongilide larvae in 36 isolates from the municipalities of Bauru, Itaquaquecetuba, Mongaguá and São Paulo. Twelve species were related as intermediate hosts: *Achatina fulica*, *Belocaulus willibaldoi*, *Bradybaena similaris*, *Deroceras laeve*, *Leptinaria concentrica*, *Limacus flavus*, *Lamellaxis goodalli*, *Prohappia besckei*, *Phyllocaulis boraceinsis*, *Phyllocaulis variegatus*, *Rumina decollata* and *Sarasinula linguaeformis*. The morphometric analyzes of L3 larvae recovered from molluscs, when compared to the isolates of *A.costaricensis* and *A.cantonensis*, indicated a greater similarity with the latter species in 24 isolates. Molecular analysis (PCR) identified 20 isolates as *A.cantonensis*. In the municipality of Bauru, infection by *Aelurostrongylus abstrusus*, pulmonary metastrongylidus of felines was observed in *A.fulica*. The same parasite was found infecting *A.fulica* and *P.boraceinsis* in the municipality of Mongaguá. In the south urban area of São Paulo, biocenose involving *A. cantonensis* infection was observed in six mollusc species and in *Rattus norvegicus*. On the East Side of São Paulo, in the residence of a laboratory confirmed human case, *A.cantonensis* larvae was found in rodent feces and in three species of mollusks. These occurrences led to the systematization of the actions involving the Public Health Laboratory and Surveillance, aiming at the rapid response of the laboratory diagnosis, immediate notification of cases and the malacological and rodent investigation.

Key words: mollusks, Metastrongyloidea, *Angiostrongylus cantonensis*, microscopy, molecular diagnostic techniques.

LISTA DE ABRVIATURAS E SIGLAS

AFA - Álcool-Formaldeído-Ácido Acético

CE- Comprimento do esôfago

CTC- Comprimento total do corpo

DAC- Distância do ânus à cauda

DPE- Distância do poro excretor

IG- Isolado de grupo

IAL- Instituto Adolfo Lutz

IL-Isolado de larva

L- Largura

LCR- Líquido cefalorraquidiano

PG-Primórdio genital

PGC- Primórdio genital à cauda

SNC-Sistema nervoso central

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número absoluto e relativo de espécies de moluscos coletados no período de novembro de 2008 a novembro de 2015 em 15 municípios do Estado de São Paulo.....	49
Tabela 2: Distribuição da porcentagem de moluscos coletados por municípios, segundo as espécies.....	50
Tabela 3: Porcentagem de moluscos utilizados para identificação das espécies e número de espécimes analisados para infecção natural de metastrongilídeos.....	51
Tabela 4: Amostras positivas para larvas de metastrongilídeos de interesse médico/veterinário distribuídas por espécies de molusco.....	52
Tabela 5: Morfometria das larvas L3 de <i>Angiostrongylus costaricensis</i> isoladas de <i>Biomphalaria glabrata</i> mantidas no Instituto Adolfo Lutz.....	54
Tabela 6: Morfometria das larvas L3 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> isoladas de <i>Biomphalaria glabrata</i> mantidas no Instituto Adolfo Lutz.....	54
Tabela 7: Morfometria de 423 larvas L3 sugestivas de <i>Angiostrongylus</i> spp isolados de 11 espécies de moluscos terrestres do município de São Paulo e Itaquaquecetuba no período de novembro de 2008 a novembro de 2015.....	56
Tabela 8. Morfometria de 94 larvas L3 sugestivas de <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> isolados de <i>Achatina fulica</i> dos municípios de Bauru e Mongaguá no período e janeiro de 2009 a janeiro de 2012.....	57
Tabela 9. Morfometria de 51 larvas L3 sugestivas de espécie não identificada isolados de <i>Achatina fulica</i> de três bairros de Bauru em fevereiro de 2012....	57
Tabela 10. Valores médios de cinco vermes adultos isolados de <i>Rattus norvegicus</i> na zona sul de São Paulo.....	63
Tabela 11. Infecções experimentais de roedores a partir de larvas de moluscos naturalmente infectados para caracterização de padrão de infecção biológica.....	64
Tabela 12. Médias morfométricas (mm) de vermes adultos recuperados de infecção experimental em ratos Wistar a partir de lesmas e <i>B.glabrata</i>	67

Tabela 13. Distribuição das amostras de moluscos naturalmente infectadas por *A.cantonensis* e *A.abstrusus* por demanda espontânea e busca ativa conforme município de origem.....71

Tabela 14. Número de moluscos coletados por busca ativa para vigilância ambiental realizada no Parque Fernanda no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2011 com valores de amostras positivas para *Angiostrongylus cantonensis*.....74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	9
Figura 2: Terminologia utilizada para caracterizar as conchas.....	19
Figura 3: Vista lateral e dorsal de uma lesma evidenciando as principais estruturas do corpo:.....	20
Figura 4: Digestão péptica de <i>pool</i> de tecidos.....	21
Figura 5: Técnica de Rugai para extração de larvas.....	21
Figura 6: Diferentes tipos de caudas de larvas L3 de metastrongilídeos.....	22
Figura 7: Parâmetros morfométricos analisados medidos em (μm) dos isolados de larvas.....	24
Figura 8: Modelo de comparação do nº de escores possíveis a partir de um isolado natural de larvas.....	26
Figura 9: Inoculação de larvas L3 de metastrongilídeo extraído a partir de lesma <i>Belocaulus willibaldoi</i> em <i>Mesocricetus auratus</i>	27
Figura 10: Armadilha instalada em área residencial urbana.....	28
Figura 11: Recipiente utilizado para infectar <i>B.glabrata</i> com larvas L1 de <i>A.costaricensis</i> / <i>A.cantonensis</i> a fim de se obter larvas L3.....	32
Figura 12: Método para isolamento de larvas.....	33
Figura 13 : Mapa do estado de São Paulo com a distribuição dos 15 municípios que encaminharam amostras de moluscos terrestre para análises.....	35
Figura 14: Distribuição geral das amostras ambientais de moluscos coletados por demandas espontâneas ou buscas ativas.....	36
Figura 15: Exemplar vivo de <i>Achatina fulica</i> proveniente do município de Bauru.....	36
Figura 16: Exemplares vivos de <i>Bradybaena similaris</i> coletados na zona sul de São Paulo.....	37
Figura 17: Exemplares vivos de <i>Bulimulus tenuissimus</i>	38
Figura 18: Exemplares vivos de <i>Lamellaxis goodalli</i>	39
Figura 19: Exemplar vivo de <i>Leptinaria concentrica</i>	40

Figura 20: Exemplar vivo de <i>Rumina decollata</i>	40
Figura 21: Exemplar fixado de <i>Subulina octona</i>	41
Figura 22: Concha de <i>Prohappia besckei</i>	42
Figura 23: Espécime vivo de <i>Deroceras laeve</i>	42
Figura 24: Espécime vivo de <i>Limacus flavus</i>	43
Figura 25: Exemplar vivo de <i>Meghimatium pictum</i>	44
Figura 26: Espécime de <i>Belocaulus willibaldoi</i>	45
Figura 27: Espécimes vivos de <i>Sarasinula linguaeformis</i>	46
Figura 28: Exemplar vivo de <i>Phyllocaulis boraceinsis</i>	47
Figura 29: Espécime vivo de <i>Phyllocaulis variegatus</i>	48
Figura 30: Morfologia das larvas L3 isoladas dos moluscos.....	53
Figura 31: Análise estatística por <i>Mann-Whitney</i> das variáveis morfométricas para comparação entre os isolados de referências.....	55
Figura 32: Análise de similaridade fenotípica por escore.....	60
Figura 33: Eventos relacionados com isolamento de nematódeo na zona sul da cidade de São Paulo.....	61
Figura 34: Vermes adultos isolados de pulmões e coração de <i>Rattus norvegicus</i> no Parque Fernanda.....	62
Figura 35: Morfologia de vermes adultos de isolados de <i>Rattus norvegicus</i> de área urbana em São Paulo.....	62
Figura 36: Morfologia de larva L1 ressecada encontrada nas fezes de <i>Rattus norvegicus</i>	63
Figura 37: Hamster com 21 dias de infecção.....	65
Figura 38: Lesões pulmonares causadas pela presença de larvas e ovos de nematódeo no pulmão de roedor.....	66
Figura 39: Vermes adultos.....	66
Figura 40: Gel PCR Convencional comparando DNAs dos isolados referência <i>A.ca</i> (<i>A.cantonensis</i>) de <i>A.co</i> <i>A. costaricensis</i> com DNAs de 29 isolados ambientais de moluscos terrestres.....	68

Figura 41: Gel PCR convencional comparando DNAs de isolados de <i>A. costaricensis</i> -IAL (CCo) e <i>A. cantonensis</i> (CCa) cedido pelo CDC Atlanta com isolado em cérebro de hamster de infecção experimental e de dois isolados naturais de larvas L1 nas fezes e de vermes adultos no pulmão de <i>R. norvegicus</i> no bairro do Parque Fernanda-SP.....	69
Figura 42: Análise molecular a partir da extração de DNA de larvas L1 de fezes e de verme isolado em pulmão de rato comparadas com controle positivo de <i>A.cantonensis</i>	69
Figura 43: Resultados da biologia molecular por PCR <i>in house</i> em L1 extraídas de fezes de <i>R. norvegicus</i> , coletadas no entorno da residência caso na Cidade Tiradentes.....	69
Figura 44: Distribuição dos municípios com moluscos naturalmente infectados por <i>A.cantonensis</i> e <i>A.abstrusus</i> no estado de São Paulo.....	70
Figura 45: Presença de entulho em área urbana do Parque Fernanda- São Paulo.....	72
Figura 46: Mapa da área onde foram realizadas as coletas no Parque Fernanda.....	73
Figura 47: Vista geral de área de busca ativa por moluscos no domicílio de criança com quadro de meningite eosinofílica na região do bairro da Guarapiranga.....	75
Figura 48: Vista geral de área de busca ativa por moluscos no domicílio de criança suspeita de quadro de meningite eosinofílica no bairro do Jaçanã, São Paulo.....	76
Figura 49: Localização geográfica e característica da região onde foi confirmado um caso autóctone de angiostrongilíase meningoencefálica na zona leste da cidade de São Paulo.....	77
Figura 50: Morfologia de vermes adultos de <i>A. cantonensis</i> obtidos de infecção experimental a partir de L3 extraídas de moluscos da espécie <i>Deroceras laeve</i>	79
Figura 51: Fluxograma implantado no Núcleo de Enteroparasitas do IAL para detecção de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em amostras ambientais de fezes de roedores ou em moluscos.....	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros morfométricos analisados medidos em (μm) das duas cepas de referências mantidas no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz utilizados nas análises por escore.....	25
Quadro 02- Resultado das análises por escore dos isolados das infecções naturais comparados com os isolados de referência (IR).....	59

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Moluscos e sua importância médico veterinária para a saúde pública.....	1
1.2 Importância médico e veterinária dos nematódeos da superfamília Metastrongyloidea.....	2
1.3 Metastrongilídeos de interesse veterinário	3
1.3.1 <i>Angiostrongylus vasorum</i>	3
1.3.2 <i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	5
1.4 Metastrongilídeos de interesse médico.....	7
1.4.1 <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	7
1.4.2 <i>Angiostrongilíase abdominal</i>	8
1.4.3 <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	9
1.4.4 Meningite eosinofílica no homem	11
1.4.5 Meningite eosinofílica causada por <i>A.cantonensis</i> no Brasil.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Procedência dos moluscos e roedores.....	18
4.2 Coleta e identificação de moluscos terrestres.....	18
4.3 Obtenção de larvas de nematódeos em moluscos.....	20
4.4 Caracterização morfológica dos isolados de metastrongilídeos.....	22
4.5 Estudo da similaridade fenotípica entre os isolados naturais das larvas L3 de metastrongilídeos com cepas de referências.....	23
4.5.1 Morfometria das larvas de metastrongilídeos.....	23
4.5.2 Análise de similaridade fenotípica por escore.....	24
4.6 Caracterização biológica dos isolados de metastrongilídeos.....	26
4.6.1 Infecção experimental em animais.....	26
4.6.2 Capturas e procedimentos em roedores sinantrópicos para constatação de infecção natural por nematódeos.....	28
4.6.3 Extração de DNA e análise molecular.....	29

4.7 Manutenção de ciclo experimental de <i>A. costaricensis</i> e <i>A.cantonensis</i> em laboratório.....	30
4.7.1 Infecção em <i>B. glabrata</i> para obtenção de larvas L3 infectantes dos nematódeos	31
4.7.2 Infecção em hamsters e <i>Wistar</i> para obtenção de vermes adultos de <i>A. costaricensis</i> e de <i>A.cantonensis</i>	32
4.7.3 Obtenção dos vermes adultos de <i>A. costaricensis</i> e <i>A.cantonensis</i>	33
4.8 Análise estatística.....	34
5.RESULTADOS	35
5.1 Regiões de procedência das amostras.....	35
5.2 Moluscos terrestres coletados e identificados	36
5.3 Distribuição de moluscos identificados segundo a espécie	48
5.4 Distribuição de moluscos identificados segundo município.....	50
5.5 Análises parasitológicas em moluscos terrestres	51
5.5.1 Caracterização das amostras de metastrongilídeos.....	51
5.5.2 Análises morfológicas das larvas de metastrongilídeos por amostra....	52
5.5.3 Análises morfométricas das larvas dos isolados de referência: <i>Angiostrongylus costaricensis</i> e <i>A. cantonensis</i>	53
5.5.4 Análises morfométricas das larvas de metastrongilídeos por amostra.....	56
5.5.5 Análise de similaridade fenotípica por escore.....	57
5.5.6 Análises de amostras ambientais associadas a roedores.....	60
5.5.7 Análise das infecções experimentais em roedores	64
5.5.8 Análise por biologia molecular.....	68
5.5.9 Distribuição ambiental dos moluscos positivos para <i>Angiostrongylus cantonensis</i> e <i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	70
5.5.10 Análise da infecção por larvas de metastrongilídeos em moluscos por demanda espontânea e busca ativa.....	70

5.5.11 Análise das coletas por busca ativa para vigilância ambiental	72
5.5.12 Análise das coletas por busca ativa para estudos de casos humanos suspeitos/ diagnosticados como meningite eosinofílica.....	74
6. DISCUSSÃO.....	81
7.CONCLUSÕES.....	100
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
ANEXOS.....	116

1. INTRODUÇÃO

1.1 Moluscos e sua importância médico-veterinária para a saúde pública

O filo Mollusca é o segundo maior filo da classificação zoológica, sendo superado apenas pelo filo Arthropoda. Caracteriza-se por ser um grupo altamente diverso quanto à morfologia, anatomia, fisiologia e ecologia (Barker, 2001) com representantes nos ambientes terrestres, de água doce ou marinhos. Estima-se que o número de espécies no mundo variam entre 80.000 e 120.000 (Simone, 1999), sendo que 30.000 espécies estão representadas por gastrópodes terrestres (Barker, 2001). A classificação tradicional da classe Gastropoda divide o táxon em três subclasses: Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonada. Destas, apenas os opistobrânquios não apresentam representantes terrestres (Simone, 1999).

Os moluscos têm participação relevante nos ecossistemas onde habitam. Possuem papel importante na geologia e paleontologia, uma vez que apresentam potencial de fossilização, servindo para estudo de estratos terrestres e datação da Terra (Thomé et al., 2006). São utilizados como alimento pelo homem, peixes, aves, répteis, anfíbios e insetos, demonstrando importante papel na cadeia trófica; ciclagem de nutrientes, sendo ainda considerados bioindicadores, devido participação relevante na caracterização de ambientes naturais, uma vez que são sensíveis à poluição (Bonetto e Tassara, 1987; Landoni, 1992; Simone, 1999; Thomé et al., 2006).

Dentre as implicações negativas atribuídas aos moluscos reside o fato de serem considerados pragas de jardins, hortas, pomares e lavouras (Thomé et al., 2006). A classe Gastropoda se destaca por representar cerca de 75% das espécies do filo. Inclui espécies hospedeiras de trematódeos e de alguns nematódeos parasitos de animais silvestres, domésticos, sinantrópicos e do homem (Ministério da Saúde, 2008 e Rey, 2008). No Brasil quatro helmintoses de importância médica e veterinária são transmitidas por moluscos: fasciolose, esquistossomose mansônica, angiostrongilíase abdominal e meningite eosinofílica por *Angiostrongylus cantonensis* (Ministério da Saúde, 2008, Caldeira et al., 2007). Alguns nematódeos metastrongilídeos também são citados como causadores de doenças de interesse veterinário como a angiostrongilose canina (Ballweber, 2012) e strongilose cardiopulmonar que acomete felinos domésticos e silvestres (Bowman et al., 2002). Desta forma, para o efetivo

controle destes agravos é de vital importância empreender ações de vigilância malacológica, com o objetivo de conhecer o potencial de transmissão das espécies hospedeiras intermediárias de metastrongilídeos de interesse médico-veterinário.

1.2 Importância médica e veterinária dos nematódeos da superfamília Metastrongyloidea

O interesse sobre os aspectos biológicos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais relacionados aos nematódeos da superfamília Metastrongyloidea tem sido crescente nas últimas décadas. A ocorrência destes parasitos em áreas, até então, destituídas de importância epidemiológica, confirma o caráter emergente de importância médica e veterinária, das infecções causadas por estes metastrongilídeos (Traversa e Guglielmini, 2008; Wang et al., 2008).

Os metastrongilídeos são formados por cerca de 180 espécies de nematóides distribuídas em 45 gêneros. Em geral, são parasitos de mamíferos, principalmente habitando pulmões e, com poucas exceções, apresentam como hospedeiros intermediários moluscos terrestres ou de água doce (Anderson, 2000).

A família Angiostrongylidae apresenta 16 gêneros e 48 espécies com ampla distribuição geográfica. Angiostrongilídeos tem sido encontrado infectando roedores, tupaídeos, mefitídeos, mustelídeos, procionídeos, felídeos, marsupiais e canídeos, e até mesmo o homem (Anderson, 2000 ; Spratt, 2015).

Atualmente 21 espécies do gênero *Angiostrongylus* têm sido descritas infectando roedores, insetívoros e carnívoros em todo o mundo (Spratt, 2015), porém apenas duas espécies têm sido apontadas como causa de enfermidade em humanos: *Angiostrongylus cantonensis* envolvido no sistema nervoso central e algumas vezes nos pulmões (Chen, 1935; Nomura e Lin, 1945) e *Angiostrongylus costaricensis* (Morera e Céspedes 1971a), que se aloja nas artérias mesentéricas, ambos podendo causar angiostrongilíase nas Américas (Morera e Céspedes, 1971b). Outros angiostrongilídeos como *Angiostrongylus vasorum*, *Angiostrongylus malaysiensis* e *Angiostrongylus mackerrasae* e *Aelurostrongylus abstrusus* são significantes como patógenos para animais, porém seu potencial zoonótico ainda não foi demonstrado (Bowman et al., 2002; Barratt et al., 2016).

Uma variedade de moluscos terrestres podem ser hospedeiros intermediários de metastrongilídeos tanto de interesse médico quanto de importância veterinária (Anderson, 2000 e Spratt, 2015). Assim, em estudos malacológicos envolvendo a infecção natural de metastrongilídeos, o diagnóstico diferencial entre os membros da superfamília *Metastrongyloidea* é de fundamental importância (Bowman et al., 2003).

1.3 Metastrongilídeos de interesse veterinário

1.3.1 *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866; Kamensky, 1905)

Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1866; Kamensky, 1905) é o agente etiológico da angiostrongilose canina. As formas adultas têm aproximadamente 13 - 21 mm (Gredal et al., 2011), localizando-se no coração direito e artérias pulmonares de cães e raposas (Morgan e Shaw, 2010). As formas larvares L1 apresentam cerca de 310 a 399 µm de comprimento e possuem um botão cefálico anterior, uma cauda em forma de S com entalhe dorsal e pequena ondulação ventral (Ballweber, 2012). O embrionamento dos ovos ocorre rapidamente ainda no tecido do hospedeiro, dando origem às larvas L1 que são transportadas pela rede capilar pulmonar e penetram nos alvéolos (Morgan e Shaw, 2010). A partir daí chegam a faringe e são deglutidas e eliminadas pelas fezes. Em moluscos, hospedeiros intermediários, as L1 desenvolvem-se até L3 (estágio infectante) em 16 a 18 dias (Ballweber, 2012), (Barçante et al., 2003a; Morgan et al., 2005). Não há dados disponíveis sobre o desenvolvimento larvário em hospedeiros paratênicos ou de transporte (aves, rãs ou roedores) (Ballweber, 2012).

O número de hospedeiros intermediários pode ser amplo, considerando-se a variedade de gastrópodes (Ferdushy et al., 2009). O hospedeiro definitivo é infectado ao ingerir um gastrópode infectado por predação, por lambadura (Barçante, 2003a; Barçante 2003b; Morgan e Shaw, 2010), ou por ingestão de larvas livres no ambiente (Morgan e Shaw, 2010). Após a ingestão, as L3 penetram na parede do sistema gastrointestinal e migram para os linfonodos viscerais, onde se desenvolvem em vermes jovens (Ballweber, 2012). Em seguida, migram por via sanguínea ou linfática para o coração ou artérias, onde se tornam vermes adultos (Morgan e Shaw, 2010).

A angiostrongilose canina é tipicamente assintomática ou associada a sinais leves e intermitentes nas fases iniciais de infecção (Bourque et al., 2008 ; Ballweber,

2012). Contudo, quando a carga parasitária é alta, pode causar hemorragias, alterações neurológicas, cardiovasculares e gastrointestinais, com ou sem disfunção respiratória (Bourque et al., 2008; Morgan e Shaw, 2010; Lepri et al., 2011; Gredal et al., 2011). Frequentemente, os animais apresentam sintomas como tosse, intolerância ao exercício, dispneia, insuficiência cardíaca direita, e outros menos específicos, como vômitos, diarreias e anorexia (Kock e Willesen, 2009).

Os parasitos podem ser encontrados em outros órgãos, como artérias pulmonares, olhos, rins, cérebro, pâncreas e artéria femoral (Oliveira-Júnior et al., 2004; Denk et al., 2009; Conboy, 2011; Lepri et al., 2011). O diagnóstico definitivo pode ser realizado pela detecção de larvas L1 nas fezes (Ballweber, 2012), ou pela lavagem traqueal ou broncoalveolar (Denk et al., 2009). A terapêutica deve ser iniciada de imediato, mesmo sem o diagnóstico definitivo (Morgan e Shaw, 2010), administrando-se moxidectina (Schnyder et al., 2009), milbemicina (Conboy, 2004), febendazol (Willesen et al., 2007) ou imidacloprid-moxidectina (Willesen et al., 2007; Ballweber, 2012).

Pode ser necessário o tratamento de suporte, conforme a sintomatologia apresentada (Kock e Willensen, 2009; Helm et al., 2010). Em regiões endêmicas, recomenda-se a prescrição mensal de anti-helmíntico como medida profilática (Schnyder et al., 2009; Conboy, 2011). Deve-se também proceder a remoção adequada das fezes dos animais infectados, de modo a interromper o ciclo de vida do parasito e evitar a contaminação ambiental (Kock e Willesen, 2009), bem como realizar exames coprológicos de controle (Ballweber, 2012).

O parasito foi descrito pela primeira vez em 1852 no sudoeste de França. Sua prevalência é acentuada neste país, sendo considerado endêmico em muitos países de clima temperado e úmido (Elsheikha et al., 2014). Embora não existam dados gerais sobre a prevalência do *A. vasorum* no Brasil, trabalhos têm demonstrado sua ocorrência em alguns estados.

O primeiro relato do parasitismo de canídeos por *A. vasorum*, foi realizado por Travassos (1927), quando descreveu *Haemostrogylus railliet* (= *A. vasorum*) recuperado do ventrículo direito e artéria pulmonar de raposas do mato (*Cerdocyon thous azarae*), provenientes do município do Rio de Janeiro - RJ. Em 1961, Gonçalves relatou, pela primeira vez no Brasil, *A. vasorum* parasitando cães domésticos no Rio Grande do Sul.

Posteriormente, foram apontados casos de infecções naturais por Langenegger, (1962) que registrou a ocorrência de *A. vasorum* em dois cães naturalmente infectados, provenientes do município do Rio de Janeiro; Fehringer e Fiedler (1977) que citaram a ocorrência de dois casos de *A. vasorum* em cães no município de Salvador- BA e Giovanonni et al., 1985 que relataram a ocorrência de *A. vasorum* em um cão adulto, procedente do interior do Estado do Paraná.

Lima et al. (1985) realizaram a descrição morfológica de espécimes de *A. vasorum*, recuperados das artérias pulmonares de dois cães, procedentes do município de Caratinga – MG. Na ocasião, os autores recuperaram larvas L1 de *A. vasorum* provenientes das fezes de um dos animais e realizaram a infecção experimental em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Posteriormente, Lima et al.(1994) relataram a infecção natural por *A. vasorum* em *Dusicyon vetulus* na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

1.3.2 *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898)

A aelurostrongilose, também conhecida por strongilose cardiopulmonar do gato e de felídeos silvestres, é causada por *Aelurostrongylus abstrusus*, um pequeno metastrongilídeo cosmopolita com 5-10 mm de comprimento, que parasita de acordo com (Leitão e Meireles, 1983; Bourdeau, 1993) as artérias pulmonares e, segundo (Soulsby, 1982; Bowman et al., 2002) os bronquíolos terminais respiratórios e ductos alveolares. O verme adulto é de difícil visualização devido a sua pequena dimensão e aspecto filiforme.

As fêmeas fecundadas eliminam ovos embrionados, que podem ser depositados nos capilares alveolares (Bourdeau, 1993), ou nos alvéolos pulmonares (Soulsby, 1982). As larvas L1 migram dos alvéolos pulmonares para a árvore brônquica, onde são deglutidas com as secreções traqueobrônquicas, percorrem o tubo digestivo, onde são eliminadas com as fezes. Sua evolução, até estágio L3, ocorre em hospedeiros intermediários como lesmas (*Deroceras* sp., *Arion* sp., *Agriolimax* sp.) ou caracóis (*Helix* sp.). Neste ciclo, podem existir hospedeiros paratênicos (aves, répteis, rãs, mamíferos insetívoros ou roedores silvestres), que se infectam ao ingerirem os hospedeiros intermediários.

Felinos domésticos ou silvestres infectam-se ao predarem os hospedeiros paratênicos, portadores de larvas encistadas do parasito. Esta parasitose apresenta período pré-patente de seis semanas e patente de até dois anos. É mais frequente em gatos jovens, devido aos hábitos de jogo, e em gatos machos, por causa dos hábitos de caça noturna (Sousa Dias, 1945; Peleteiro et al., 1989; Bourdeau, 1993; Miró Corrales e Gómez Bautista, 1999).

As infecções em felinos imunocompetentes manifestam-se de forma subclínica, devido a evolução autolimitante (Peleteiro et al., 1989; Soulsby, 1982; Quinn et al., 1997), já os animais com deficiências imunitárias são sintomáticos (Soulsby, 1982). Os principais achados clínicos são: tosse seca causada por traqueíte, bronquite ou até pneumonia, podendo ser acompanhada de febre, caso haja infecção bacteriana secundária.

Por outro lado, há animais que apresentam polipneia ou dispneia, sendo a tosse, nestes casos, pouco frequente ou mesmo ausente. Os sintomas respiratórios são devidos aos ovos e larvas depositados nos alvéolos pulmonares e à irritação mecânica produzida pelas larvas vivas nos aparelhos respiratório e digestivo. Manifesta-se, igualmente, eosinofilia acentuada que persiste até 24 semanas de infecção. Outros sintomas, menos frequentes, incluem mal-estar, inapetência, emagrecimento, crises epileptiformes, perturbações vestibulares e hemorragias gengivais (Soulsby, 1982).

Embora estes sintomas, aparentemente, não estejam relacionados com a parasitose, costumam desaparecer quando é instaurado o tratamento antiparasitário (Bowman et al., 2003). Este pode ser feito com diferentes anti-helmínticos como: fenbendazol, albendazol, levamisol, mebendazol, praziquantel e ivermectina (Miró Corrales e Gómez Bautista, 1999), associados a glicocorticoides e bronco dilatadores (Hawkins et al., 1989).

O diagnóstico laboratorial baseia-se na identificação da larva L1 nas fezes dos gatos pelo uso diferentes técnicas (Hawkins *et al.*, 1989; Bourdeau, 1993; Miró Corrales e Gómez Bautista, 1999). A eliminação de larvas nas fezes não ocorre de forma contínua, e sua detecção dependerá do momento da coleta. Para evitar falhas no diagnóstico recomenda-se analisar fezes de 24 horas.

O lavado traqueobrônquico, após sua concentração por centrifugação, também pode ser utilizado no diagnóstico (Hawkins et al., 1989). Como prova complementar, o

exame radiológico permite a observação das lesões nos pulmões e na pleura (Dunn, 1978; Miró Corrales e Gómez Bautista, 1999).

Esta doença em felinos já foi descrita em quase toda a Europa, principalmente na França, Espanha e Portugal (Sousa Dias, 1945; Peleteiro et al., 1989; Bourdeau, 1993; Miró Corrales e Gómez Bautista, 1999). No Brasil há pouco registro de aelurostrongilose. Em 1998, foi assinalado o primeiro registro *pós morte* em felino doméstico no Rio de Janeiro, Brasil (Scofield et al., 2005).

Entretanto, a infecção natural em *Achatina fulica* por larvas L3 de *A.abstrusus* foi relatada em Manaus, Goiás, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Sergipe (Thiengo et al., 2008; Ohlweiler et al., 2010b; Andrade-Porto et al.,2012).

1.4 Metastrongilídeos de interesse médico

1.4.1 *Angiostrongylus costaricensis* (Morera e Céspedes, 1971)

Angiostrongylus costaricensis pertencente à família Angiostrongylidae e foi descrito por (Morera e Céspedes, 1971a). A espécie apresenta corpo filiforme, macho medindo aproximadamente 20 mm de comprimento e bolsa copuladora reduzida com dois espículos iguais e finos e gubernáculo presente. A fêmea mede aproximadamente 33 mm de comprimento, ânus e vulva localizados na extremidade final da região posterior, onde há um pequeno espinho. Nos dois sexos, a abertura oral é rodeada por seis pequenos lábios. Os ovos são elípticos e não se encontram embrionados no momento da postura (Morera e Céspedes,1971b; Mota e Lenzi, 1995).

O parasito apresenta como hospedeiros definitivos roedores das espécies *Sigmodon hispidus*, *Rattus rattus*, *Zigodontomys microtinus*, *Lyomys adspersus* e *Oryzomys fulvescens* (Morera , 1973). No entanto, vermes adultos já foram encontrados em outros vertebrados, incluindo os humanos (Morera e Céspedes,1971b). Como hospedeiros intermediários são apontados uma grande variedade de espécies de moluscos terrestres (Rambo et al.,1997).

A forma adulta do *A. costaricensis* localiza-se nos ramos superiores da artéria mesentérica. As fêmeas fazem a ovipostura no local e seus ovos são levados através da corrente sanguínea para a parede intestinal, onde ocorre a eclosão das larvas L1 e eliminação junto com as fezes (Mota e Lenzi, 2005). No meio ambiente

as larvas L1 infectam os hospedeiros intermediários por via oral ou percutânea, onde sofrem duas mudas (L2 e L3). As L3 infectantes ficam encistadas nos tecidos ou podem ser eliminadas junto com a mucosidade dos moluscos (Mendonça et al.,1999).

Os roedores e outros vertebrados infectam-se, provavelmente, pela ingestão de moluscos ou vegetais contaminados pela L3. As larvas atravessam a parede intestinal e migram pelos vasos sanguíneos e linfáticos, onde mudam para L4, se transformando em vermes adultos nas artérias mesentéricas (Mota e Lenzi, 2005).

1.4.2 Angiostrongilíase abdominal

Angiostrongylus costaricensis pode causar doença inflamatória em humanos, denominada de angiostrongilíase abdominal. A transmissão ocorre pela ingestão acidental de moluscos, alimentos *in natura* ou por água contaminada com larvas de terceiro estágio (Bender et al., 2003; Mentz et al., 2004). Acredita-se que a transmissão humana seja favorecida pela domiciliação dos hospedeiros intermediários e definitivos (Graeff- Teixeira et al.,1991).

O homem é considerado um hospedeiro acidental, uma vez que as larvas não são eliminadas com as fezes para o meio ambiente (Mendonça et al., 1999; Mota e Lenzi, 2005). A intensa reação inflamatória tecidual, retém os ovos, impedindo a liberação das larvas de primeiro estágio (Bender et al., 2003). As manifestações clínicas são: febre, anorexia, náuseas, vômito, dor abdominal e eosinofilia.

Em alguns quadros são encontrados massa palpável no quadrante abdominal inferior direito, que quando associado aos sintomas, leva a suspeita de um quadro apendicular agudo ou de neoplasia obstrutiva do cólon (Pena et al., 1995; Mendonça et al.,1999). Esta doença tem sido descrita com ampla distribuição geográfica nas Américas. No Brasil, o maior registro dos casos foi nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, (Bender et al., 2003), além de São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal e Espírito Santo (Pena et al., 1995). Graeff-Teixeira et al.(1991) relataram que a angiostrongilíase é uma doença sazonal que afeta adultos e crianças.

Por outro lado, poucos pacientes são diagnosticados no Brasil devido à dificuldade de padronização de testes imunológicos necessários para a confirmação clínica da doença (Bender et al., 2003). Não há tratamento medicamentoso recomendado, pois as drogas de ação tecidual testadas em modelo experimental

podem agravar o quadro ao induzir migração errática dos parasitas e desencadear trombozes arteriais (Graeff-Teixeira et al., 1997). O controle dessa doença se faz pelo combate aos roedores, pelo cuidado no preparo dos alimentos e cuidados básicos de higiene, como lavar as mãos (Mendonça et al., 1999).

1.4.3 *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935)

A espécie foi inicialmente denominada de *Strongylus vasorum* (Baillet 1866) por Kamenskii. Identificada como *Pulmonema cantonensis* (Chen, 1935) e *Haemostrongylus rattii* por Yokogawa (Yokogawa, 1937), foi inserida por Ash (Ash, 1967) no gênero *Angiostrongylus* e, finalmente em 1946, Dougherty a classificou como *Angiostrongylus cantonensis* (Dougherty, 1946) e foi relatada infectando roedores em diferentes regiões do mundo (Anderson, 1978).

O ciclo biológico de *A. cantonensis* é heteroxeno e envolve necessariamente a participação de dois hospedeiros: os moluscos hospedeiros intermediários, roedores hospedeiros definitivos e crustáceos (camarão e caranguejo terrestre), planárias terrestres, sapos e pequenos lagartos como hospedeiros paratênicos (Lai et al., 2016) (Figura1).

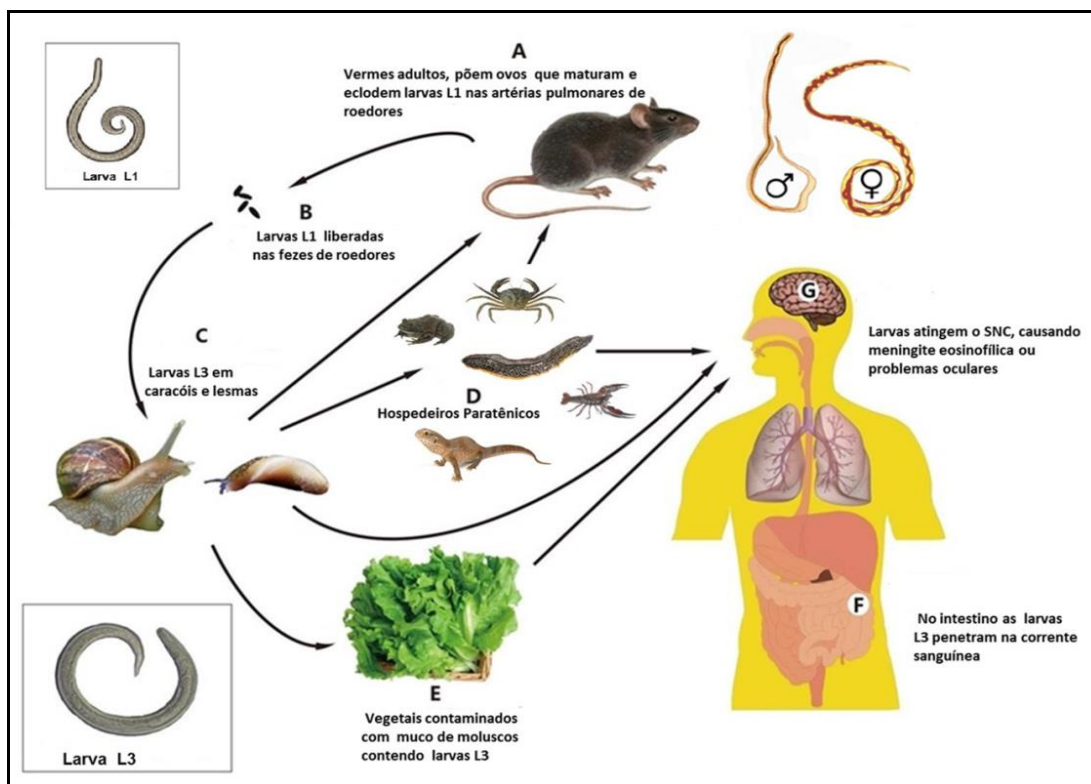


Figura 1. Ciclo biológico de *Angiostrongylus cantonensis*. **Fonte:** (Adaptado de Lai et al. (2016)).

Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies de moluscos como hospedeiro intermediário, sendo o caracol africano, *A.fulica* usualmente associado à expansão deste helminto. A participação de moluscos terrestres e aquáticos tem sido registrada, demonstrando a grande adaptação do parasito aos seus hospedeiros intermediários, fator que favorece diretamente a disseminação da meningoencefalite eosinofílica como agravo humano (Harris e Cheng, 1975; Caldeira et al., 2007).

Roedores (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*), em condições naturais, se infectam a partir da ingestão das larvas L3, encistadas no tecido muscular de hospedeiros intermediários. As larvas penetram na corrente sanguínea e alcançam o sistema nervoso central (SNC), onde realizam duas mudas, se tornando vermes jovens que, em seguida, migram para as artérias pulmonares onde desenvolvem a maturidade sexual e tornam-se adultos por volta de 42 a 45 dias após infecção. As fêmeas podem medir até $36,8 \pm 0,99$ mm. Os machos são menores podendo medir até $26,0 \pm 0,4$ mm. É relatado que uma fêmea adulta pode vir a produzir diariamente cerca de 15.000 ovos (Kino, 1984; Wang et al., 2008).

Os ovos são levados para os capilares pulmonares de onde eclodem larvas de primeiro estágio que migram pelos bronquíolos até a faringe, onde são deglutidas. Após seis a oito semanas as larvas L1 são liberadas nas fezes, que podem ser ingeridas pelos hospedeiros intermediários evoluindo para larvas L3 (estágio infectante).

Anfíbios, crustáceos, planárias terrestres, peixes, e répteis podem atuar como hospedeiros paratênicos ao ingerir moluscos infectados. Nestes hospedeiros as larvas não se desenvolvem em um próximo estágio, mesmo assim fazem parte da cadeia de transmissão do parasita (Thiengo et al., 2007 e Wang et al., 2008).

O homem se infecta ocasionalmente ao ingerir os hospedeiros intermediários, hospedeiros paratênicos, água ou alimentos que contenham larvas infectantes (Wang et al., 2008).

Há pouco conhecimento sobre a prevalência da infecção deste parasito em hospedeiros paratênicos. Planárias terrestres podem albergar larvas infectantes de *A. cantonensis* e transmiti-las a partir da ingestão de vegetais consumidos *in natura*. Da mesma forma, a infecção natural de rãs e lagartos com *A. cantonensis* já foi

demonstrado e o consumo destes animais tem sido relacionado a inúmeros surtos em países asiáticos (Wang et al., 2008).

A ecologia da angiostrongilíase está relacionada com o ambiente e a fatores que favoreçam a sobrevivência das populações de moluscos e roedores. A frequência da parasitose em humanos depende da abundância desses hospedeiros, do grau de infecção, do hábito alimentar (consumo de moluscos crus, crustáceos, peixes e verduras mal lavadas) e do contato direto com moluscos infectados ou com o muco liberado por eles (Acha e Szyfres, 2003; Wang et al., 2008).

1.4.4 Meningite eosinofílica no homem

O primeiro caso de meningoencefalite eosinofílica por *Angiostrongylus cantonensis* foi documentado em 1945 em Taiwan na China (Nomura e Lin 1945; Barratt et al., 2016). A partir desta região a zoonose se disseminou para as Américas no século XX (Pascual et al., 1981), com ocorrência de surtos e de casos isolados. No continente americano, o primeiro relato da doença ocorreu em Cuba (Aguiar et al., 1981) e, posteriormente, nos Estados Unidos (New et al., 1995), Jamaica (Barrow et al., 1996), Brasil (Caldeira et al., 2007; Lima et al., 2009) e mais recentemente no Equador (Dorta-Contreras et al., 2011). As larvas infectantes L3 quando ingeridas são liberadas no intestino e invadem a parede intestinal entrando na circulação, passando pelo fígado, coração, pulmões e, finalmente chegam ao cérebro onde se transformam em larvas de quarto estágio (L4) e geralmente morrem de um a dois meses, causando intensa reação inflamatória (Hughes et al., 2003).

As larvas L3 podem estar presentes no cérebro e no líquido cérebro-espinhal (LCR) em uma ou três semanas após a infecção (Wilkins et al., 2013). As manifestações clínicas, severidade da doença e o período de incubação estão associados diretamente com a quantidade de larvas ingeridas e da resposta inflamatória granulomatosa ou eosinofílica. Em cortes histológicos observam-se em torno dos vermes, células inflamatórias (histiócitos, neutrófilos e eosinófilos), congestão vascular, hemorragia subdural, subaracnoide, necrose focal e hemorragia cerebral. O dano neurológico é causado tanto pelos danos físicos das larvas quanto pela reação imune do hospedeiro às larvas, que é mais intensa para as larvas mortas do que as larvas vivas (Cross, 1987; Alto, 2001).

As manifestações clínicas podem incluir dores de cabeça, rigidez na nuca, febre, vômito, náuseas, irritabilidade, retenção ou incontinência urinária, prurido, dor abdominal, distúrbios visuais e lesões oculares permanentes (Alicata, 1965; Punyagupta et al., 1975; Kuberski e Wallace, 1979; Koo et al., 1988; Wang et al., 2008).

O histórico de deslocamentos por áreas endêmicas, diagnóstico sorológico associado a manifestações clínicas e presença de eosinófilos no líquido cefalorraquidiano (LCR) sugerem o quadro de meningoencefalite eosinofílica (Panackel et al., 2006). Durante a infecção, a quantidade de leucócitos no LCR é frequentemente de 150 e 200 células/ μ l. Pleocitose eosinofílica excede 10% em mais de 90% dos pacientes (Eamsobhana, 2013). Eosinofilia é encontrada no sangue periférico em aproximadamente 2/3 dos pacientes (Eamsobhana e Yong, 2009).

As larvas raramente são encontradas no LCR (Wang et al., 2008) e, para a confirmação do diagnóstico presuntivo, testes imunológicos têm sido muito úteis no apoio ao diagnóstico clínico, sendo o método de Elisa o mais empregado (Wang et al., 2008; Eamsobhana e Yong, 2009; Eamsobhana, 2013). O diagnóstico molecular também tem sido utilizado para detecção do DNA de *A. cantonensis* no sistema nervoso central (SNC) de pacientes (Lima et al., 2009; Wilkins et al., 2013).

A gravidade da angiostrongilíase pode variar entre leve a fatal, dependendo das partes envolvidas do cérebro e da carga parasitária. Na maioria dos pacientes a infecção é autolimitada porém casos graves podem levar a danos neurológicos permanentes ou, morte em 2-3% dos casos (Eamsobhana e Yong, 2009).

O manejo clínico inclui a administração de drogas anti-helmínticas, medidas de suporte e às vezes até intervenção cirúrgica. Punção lombar repetida ou transfusão de manitol são empregadas para aliviar sintomas como dores de cabeça e vômitos, diminuindo a pressão intracraniana (Chotmongkol et al., 2000).

A remoção cirúrgica de vermes é um método recomendável no tratamento da angiostrongilíase ocular (Toma et al., 2002; Kumar et al., 2005; Malhotra et al., 2006; Sinawat et al., 2008). A utilização dos anti-helmínticos é controversa devido ao seu potencial de exacerbar a inflamação (Bowden, 1981; Hidelaratchi et al., 2005). Ainda assim, albendazol e mebendazol são amplamente utilizados na prática clínica (Sawanyawisuth e Sawanyawisuth, 2008).

Levamisol é outro anti-helmíntico com boa eficácia, usado no tratamento de crianças (Hwang, 1997). Tiabendazol não apresentou efeito apreciável quando administrado na dose de 50 mg / kg / dia por 3 dias (Kliks et al., 1982).

Os corticosteroides são uteis no tratamento devido a ação anti-inflamatória (Chotmongkol et al., 2000; Tsai et al., 2004; Sawanyawisuth e Sawanyawisuth, 2008). Atualmente, a combinação de anti-helmínticos e corticosteroides tem sido recomendada para o tratamento de pacientes com angiostrongilíase (Chotmongkol et al., 2004; Chotmongkol et al., 2006).

1.4.5 Meningite eosinofílica causada por *A.cantonensis* no Brasil

Hospedeiros definitivos e intermediários naturalmente infectados por *A.cantonensis* já foram encontrados nos estados do Pará, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, demonstrando a existência de biocenose em território brasileiro. (Thiengo et al., 2010; Simões et al., 2011; Cognato et al., 2013; Morassutti et al., 2014).

O primeiro caso de angiostrongilíase por *A.cantonensis* ocorreu no Brasil em 2006, onde um paciente HIV-positivo no Rio de Janeiro, com histórico de consumo de moluscos crus foi diagnosticado com meningite eosinofílica. A presença de anticorpos específicos, detectada pela técnica de ELISA, contra antígeno bruto de *A. cantonensis*, e a exclusão de outros agentes etiológicos definiu o diagnóstico (Morassutti et al., 2014).

No ano de 2007, em Cariacica, estado de Espírito Santo, dois pacientes do sexo masculino com 22 e 39 anos de idade, relataram a ingestão *in natura* de lesmas (*Sarasinula marginata*). Quatro dias depois os pacientes apresentaram dor na região abdominal, cefaleia, mialgia, artralgia, rigidez de nuca, desorientação, disartria e paralisia de membros inferiores. Os resultados laboratoriais apontaram valores relativos de eosinófilos no LCR de 20-45%. O diagnóstico de angiostrongilíase foi confirmada pela PCR em tempo real nas amostras de LCR (Caldeira et al., 2007). No mesmo ano, outro caso foi identificado em paciente de um ano e seis meses de idade, por busca ativa em hospital de Vila Velha, ES (Caldeira et al., 2007).

Caso fatal de meningite foi registrado em paciente do sexo feminino de 26 anos de idade no ano de 2009, na cidade de Olinda, PE. A paciente apresentou eosinorraquia de 87% associada a sintomas como dor articular e sonolência. A constatação de DNA específico do parasito no LCR pela PCR em tempo real confirmou o diagnóstico (Lima et al., 2009).

Em 2013, um jovem da cidade Viamão, Porto Alegre com deficiência mental apresentou quadro de infecção por *A. cantonensis*, com confirmação laboratorial por imunodiagnóstico (Morassutti et al., 2014).

No estado de São Paulo os primeiros casos de meningite eosinofílica por *A. cantonensis* foram registrados em 2010. Até setembro de 2016, vinte três casos humanos suspeitos foram investigados pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), havendo confirmação laboratorial em nove deles (39%). Cinco casos foram identificados em diferentes distritos do município de São Paulo e quatro no município de Mongaguá, litoral Sul do estado (Melo et al., 2017).

Embora já existam casos de angiostrongilíase eosinofílica confirmados no Brasil acredita-se que a doença possa estar subestimada. Conforme casuística publicada pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Laboratório de Referência Nacional para o agravo, até o ano de 2014, das 80 amostras analisadas de soro e liquor, encaminhadas dos estados do Paraná, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo, 38 foram reativas pela técnica de ELISA e confirmadas pela técnica de Western blot ou por PCR em tempo real (Morassutti et al., 2014). Considerando o aumento da capacidade de resposta dos laboratórios e a conscientização de médicos e outros profissionais de saúde sobre a doença, novos casos poderão ser identificados em futuro próximo (Melo et al., 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar das infecções humanas causadas por metastrongilídeos já terem sido descritas no Brasil, os conhecimentos são pouco difundidos e restritos a algumas áreas geográficas do país (Maldonado Jr, 2010). A dificuldade em se estabelecer, de maneira mais precisa, o diagnóstico clínico e laboratorial pode ser uma das causas das subnotificações da doença e do desconhecimento entre os profissionais de saúde. A baixa prevalência em nosso meio pode estar relacionada também a fatores culturais como o hábito alimentar da população e a fatores ambientais (Thiengo et al., 2010). A temperatura ambiente pode interferir tanto na biologia dos hospedeiros intermediários quanto no desenvolvimento dos parasitos nestes hospedeiros. A influência do clima pode ser a justificativa, por exemplo, da transmissão sazonal da angiostrongilíase abdominal em áreas endêmicas do sul do país, onde a ocorrência da infecção tende a diminuir no inverno (Graeff-Teixeira et al., 1991).

A busca de novos conhecimentos sobre as angiostrongilíase está relacionada com a expansão da *Achatina fulica* no território nacional e associado aos relatos de infecção natural por *A. cantonensis* e aos casos humanos de meningite eosinofílica recentemente registrados (Thiengo et al., 2010; Maldonado Jr et al., 2010).

Achatina fulica foi introduzida no Brasil para fins comerciais, mas o desinteresse econômico fez com que esta espécie se dispersasse pelo país invadindo tanto áreas silvestres como urbanas. Tem sido apontada como praga, ocorrendo em todos os estados brasileiros com exceção do Acre (Thiengo et al., 2010). Em São Paulo apresenta ampla dispersão com registro da sua presença em 105 municípios (Ohlweiler et al., 2010b).

As investigações malacológicas decorrentes dos primeiros casos humanos de meningites eosinofílica no município de Cariacica, Estado do Espírito Santo, revelaram alta infecção do parasito em moluscos terrestres, incluindo *Achatina fulica*. Infecções por *A. cantonensis* também foram relatadas nesta espécie de molusco proveniente do município de São Vicente, litoral de São Paulo e mais recentemente nos estados de Pernambuco, Rio de Janeiro e Santa Catarina (Caldeira et al., 2007, Thiengo et al., 2010; Maldonado Jr, 2010).

Como complementação das ações em vigilância no Estado de São Paulo, o Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz, iniciou em 2008 a análise

parasitológica em moluscos terrestres urbanos provenientes de municípios da região metropolitana, litoral e interior paulista, com objetivo de avaliar o potencial de risco exercido por estes hospedeiros na saúde humana e de animais (Mota e Pinto, 2010). A presença de *A. fulica* com infecção natural por larvas de *Aelurostrongylus abstrusus*, parasito de gatos, foi observada em espécimes coletados dos municípios de Bauru e Mongaguá, assim como a presença de outras larvas de metastrongilídeos, com características morfométricas sugestivas de *Angiostrongylus vasorum*, *A. cantonensis* e *A. costaricensis* parasitando lesmas e caracóis capturados no município de São Paulo (Mota et al., 2009).

As notificações no ano de 2010 sobre quatro casos de meningite eosinofílica no município de Mongaguá e um caso na Zona Sul do município de São Paulo, cuja infecção mais provável foi por *A. cantonensis*, associadas às informações já existentes sobre as atividades de monitoramento da circulação dos parasitos no ambiente, demonstra a necessidade de adoção de medidas como: a intensificação e ampliação da vigilância malacológica, visando o controle e detecção da infecção natural em moluscos em áreas de risco; a implantação de ações de vigilância para detecção de casos de meningites eosinofílicas e o aprimoramento das técnicas laboratoriais que permitam tanto o diagnóstico específico quanto o diagnóstico diferencial com outras helmintíases (Ciaravolo et al., 2010).

Neste contexto, foi conduzido estudo sobre a circulação dos nematódeos da superfamília Metastrongyloidea identificando os hospedeiros intermediários de maior potencialidade nas áreas trabalhadas e possibilitando comparação com os dados já existentes em outras regiões do país. Procurou-se também estabelecer metodologias mais adequadas para caracterização fenotípica e genotípica para metastrongilídeos de interesse médico, que possam servir de apoio a programas de vigilância em laboratórios de saúde pública.

E finalmente, contribuir para a implantação de um sistema de informações e definição de fluxos de ações entre as unidades laboratoriais, a vigilância ambiental e epidemiológica nas angiostrongilíases humanas no âmbito do Estado de São Paulo.

3. OBJETIVOS

Geral:

Desenvolver um estudo prospectivo para avaliar a infecção natural por metastrongilídeos de interesse médico e veterinário em moluscos de diferentes áreas em municípios do estado de São Paulo.

Específicos:

- Identificar as espécies de moluscos terrestres provenientes de áreas urbanas de municípios paulistas e avaliar o potencial destas como hospedeiras intermediárias de angiostrongilíases humanas e veterinárias;
- Identificar e caracterizar por parâmetros morfológicos e moleculares os metastrongilídeos isolados de moluscos hospedeiros intermediários;
- Correlacionar a presença de gastrópodes terrestres naturalmente infectados pelo *Angiostrongylus cantonensis* com roedores sinantrópicos parasitados a fim de se constatar a cadeia natural de transmissão;
- Aplicar os conhecimentos para subsidiar ações de vigilância em saúde na angiostrongilíase causada por *A.cantonensis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Procedência dos moluscos terrestres

Para o estudo foram incluídos todos os moluscos recebidos pelo Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz no período de novembro de 2008 a dezembro de 2015. Os encaminhamentos foram divididos em duas categorias: demanda espontânea ou busca ativa. Na primeira, foram agrupadas as solicitações provenientes de demandas espontâneas geradas por municípios ou pelos serviços estaduais e municipais de vigilância epidemiológica do estado. Na segunda, foram consideradas as situações em que houve busca ativa de moluscos decorrente das ações de vigilância epidemiológica relacionadas a casos humanos suspeitos ou confirmados de angiostrongilíase cerebral e, ainda em situações de monitoramento ambiental em áreas onde foi constatada a biocenose, caracterizada pela presença de moluscos e/ou roedores infectados.

4.2 Coleta e identificação de moluscos terrestres

Os procedimentos de coleta provenientes de demanda espontânea e de busca ativa seguiram as seguintes recomendações:

- Coletar manualmente com uso de luvas e pinças;
- Procurar os espécimes vivos durante período diurno em diferentes substratos utilizados como sítio de repouso, tais como: substratos rochosos, serrapilheira, troncos caídos, pedaços de madeira, plásticos e outros materiais inservíveis, vegetação rasteira e arbustiva e sobre o tronco, galhos e folhas de árvores em ambientes urbanos;
- Acondicionar os moluscos em recipientes plásticos com tela em tampa, sendo adicionada gaze umedecida e encaminhado ao Núcleo de Enteroparasitas do IAL em até 48 horas.

Os gastrópodes coletados foram mantidos em terrários e alimentados diariamente com alface fresca até sua identificação e posterior pesquisa da infecção natural por larvas de metastrongilídeos.

Para a diferenciação de espécies de moluscos, as feições externas do corpo apresentam os principais componentes (Stanisic et al., 2010), sendo assim foram observados os tegumentos das lesmas e morfologia das conchas nos caracóis com sob esteromicroscópio (Stemi 2000C Carl Zeiss), com aumento variando de 6,5 a 50X. As principais características diagnósticas observadas na concha dos caracóis foram: perfil, tamanho, cor, número de voltas e ornamentação (Figura 2). A chave de identificação para famílias e a lista das espécies foi baseada na sistemática atual (Salgado e Coelho, 2003; Simone, 2006; Stanisic et al., 2010).

Para identificação das lesmas foi observada a variação do tamanho do corpo e sua coloração, presença de concha interna reduzida (Figura 3). Em algumas espécies a coloração e consistência do muco também foram utilizados como critério diagnósticos (Thomé e Lopes 1973), além da morfologia do aparelho reprodutor das lesmas (Gomes, 2007) (Figura 3C).

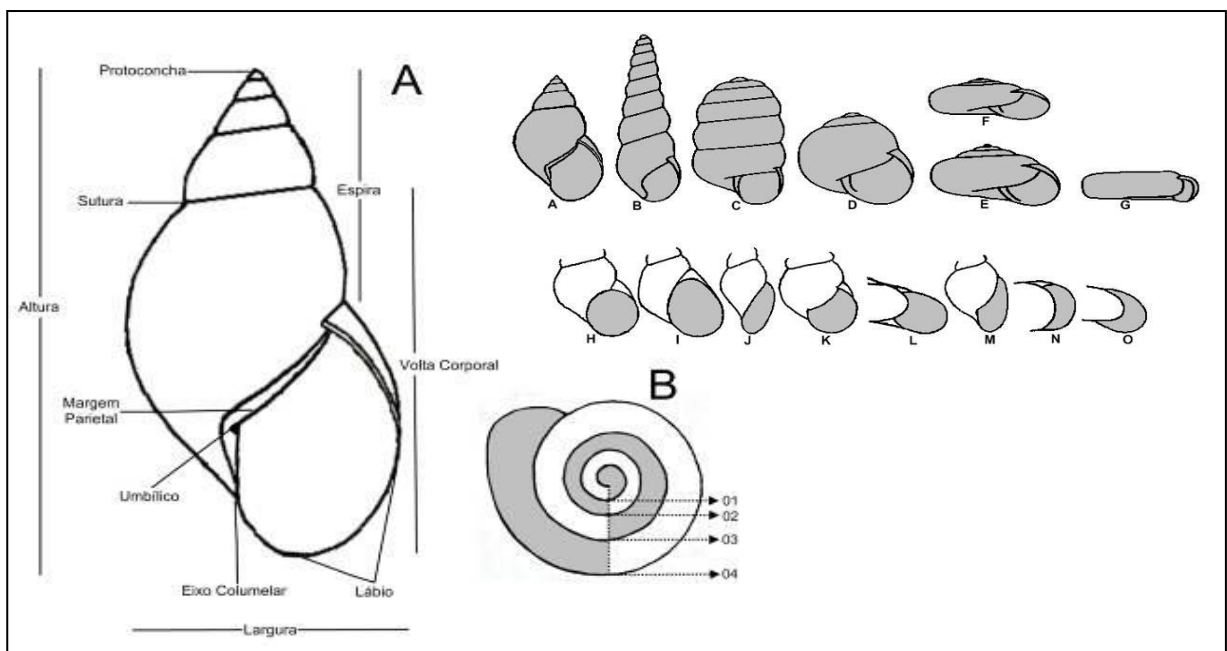


Figura 2: (A) Concha padrão: terminologia utilizada para caracterizar as conchas. Perfil da concha: formas básicas (A-G) e forma da abertura (H-O). Concha: A, cônica; B, cônica alongada até turridiforme; C, cilíndrica-pupiforme; D, globosa; E, variação entre triangular, trocóide, bicônica; F, deprimida; G, discóide. Abertura: H, arredondada; I, oval; J, oval-alongada; K, semicircular; L, semicircular deprimida; M, semi-ovalada, N, semicircular alongada; O, oblíqua. (B) Conchas sob vista apical: imagem ilustrando o método utilizado para contagem do número de voltas. **Fonte:** Adaptado a partir de Burch, 1962).

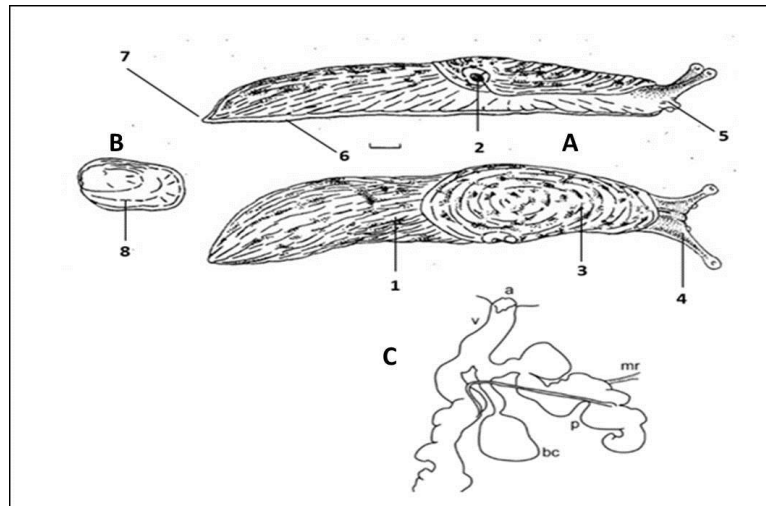


Figura 3: (A) Vista lateral e dorsal de uma lesma evidenciando as principais estruturas do corpo: 1 (tegumento do dorso) , 2 (pneumostômio) , 3 (pequena concha interna, sob o manto), 4 (tentáculos superiores e olhos, 5 (tentáculos inferiores), 6 (sola, pé), 7 (cauda). **B** – Concha interna (tipo unguiforme). **C**- Esquema do sistema reprodutor de uma lesma: **a** : átrio; **v**, vagina; **mr** , músculo retrator do pênis; **p**, pênis e **bc**, bursa copulatrix. **Fonte:** Adaptado de Mollusca of Belarus- disponível em: <http://mollusca-g2n.weebly.com/deroceras-laeve.html> acesso em 15/07/2017.

4.3 Obtenção de larvas de nematódeos em moluscos

Os moluscos foram agrupados por espécie, analisados em *pool* e cada grupo representou uma amostra ou um isolado. Os animais foram abatidos por meio de incisão transversal, do sistema nervoso central, na porção posterior da cabeça, próximo a inserção dos tentáculos. Os caracóis foram eviscerados por meio do rompimento mecânico da concha e a massa corpórea foi retirada com pinça. Em seguida, as vísceras foram separadas das porções fibromusculares e ambas fragmentadas, separadamente, com auxílio de tesoura cirúrgica. Já as lesmas foram totalmente fragmentadas. Cada 20 indivíduos analisados por espécie correspondeu a um *pool*. Aos fragmentos foram adicionados separadamente solução aquosa de pepsina (Sigma P-7125) 4mg% e ácido clorídrico (Merck PA) 0,7% e incubados a 37°C por duas horas (Figura 4). Após este período, os *pools* de tecidos foram submetidos à extração de larvas pela técnica de Rugai (Rugai et al.,1954) (Figura 5). Os sedimentos foram observados em microscópio estereoscópico (Zeiss, Stemi 2000C).

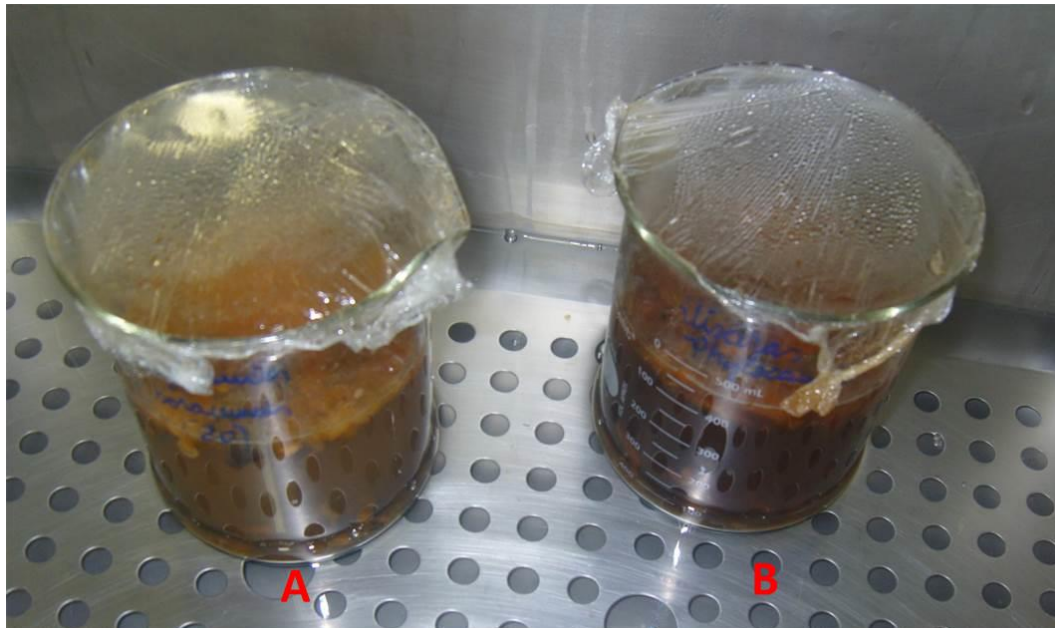


Figura 4. Digestão péptica de *pool* de tecidos (A) e de *pool* de vísceras (B) de moluscos incubadas a 37°C. **Fonte:** Mota DJG 2010.

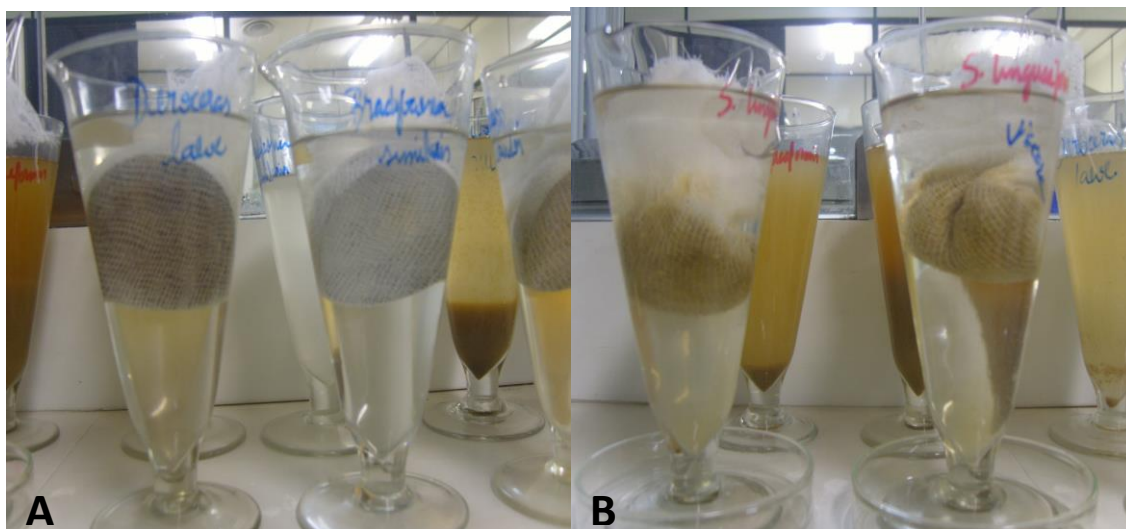


Figura 5. Técnica de Rugai para extração de larvas: A extração de larva da porção fibromuscular de moluscos digeridos (note que os tecidos foram acondicionados em latinhas do tipo pomada envolvidas em gaze); e em B extração a partir de fragmentos de vísceras digeridas (note que o material foi envolvido por gaze de oito dobradas formando uma “trouxa” que envolve as vísceras). **Fonte:** Mota DJG 2010.

As larvas recuperadas em vidro relógio foram lavadas com água declorada, transferidas uma a uma para placas de Kline, com auxílio de micropipetas, e em seguida triadas conforme as características morfológicas. Todas as larvas que não apresentaram padrão característico de metastrongilídeos não foram incluídas neste estudo.

Dependendo do número de larvas de metastrongilídeos selecionadas foram realizados os seguintes procedimentos: para estudos morfológicos e morfométricos utilizaram-se até 50 espécimes, que foram fixados em álcool 70%, à 60°C; para análises moleculares, um a dez espécimes eram congelados a -20°C; e para inoculação de roedores, oito a 30 espécimes vivos foram separados. Para esta finalidade foram empregados ratos albinos Wistar ou hamster, conforme disponibilidade de animais no momento do isolamento das larvas.

4.4 Caracterização morfológica dos isolados de metastrongilídeos

Como critério de seleção para larvas metastrongilídeos foram consideradas as características mais evidentes dos estágios evolutivos (L1, L2, L3) correspondentes ao tipo de esôfago (claviforme) e das respectivas caudas, conforme os diferentes gêneros e espécies (Ash, 1970; Morera, 1973; Anderson, 2009). A Figura 6 mostra os diferentes padrões de caudas (indicados por setas) das larvas L3 utilizados na identificação morfológica, conforme os gênero e espécies de metastrongilídeos que poderiam ser encontrados.

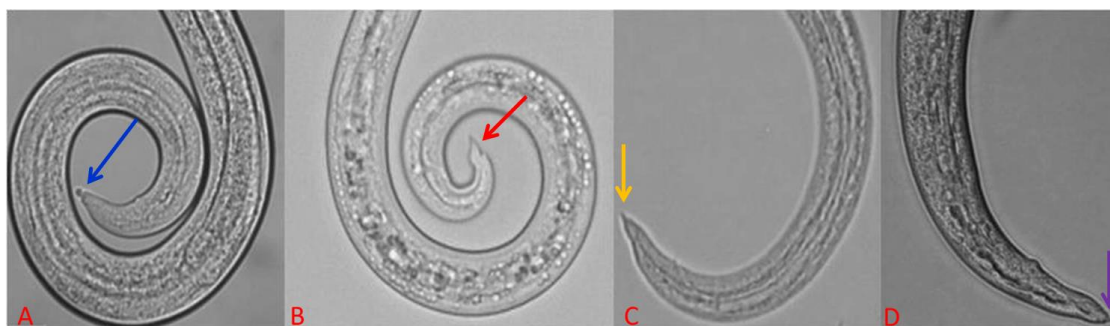


Figura 6. Diferentes tipos de caudas de larvas L3 de metastrongilídeos : **A** – *Aelurostrongylus abstrusus* extremidade posterior arredondada (quinóbio); **B** – *Angiostrongylus vasorum*, cauda pontiaguda e apêndice digitiforme; **C**: *Angiostrongylus costaricensis* e; **D** – *Angiostrongylus cantonensis*, extremidade posterior pontiaguda. **Fonte:** Adaptado de Neuhauss et al., 2007; Thiengo et al., 2010 ; Gianelli et al., 2013 e Rinaldi et al., 2014.

4.5 Estudo da similaridade fenotípica entre os isolados naturais das larvas L3 de metastrongilídeos com cepas de referências

4.5.1 Morfometria das larvas de metastrongilídeos

Após os procedimentos de triagem, somente, as larvas com características L3 (infectantes) de cada amostra foram fotografadas com câmera digital (Cânon, Power Shot A640) acoplada ao microscópio óptico comum (Carl Zeiss, Jenaval). As estruturas obtidas nas imagens foram medidas com o auxílio do software Axio Vision 4.8. Foi padronizado o uso de no máximo 30 larvas para cada amostra, no entanto, este número foi menor nos casos onde a taxa de recuperação larval foi baixa. As amostras que continham larvas de metastrongilídeos (positivas) foram designadas, neste estudo, como isolados e foram codificados como se segue: I = isolado de larvas L3; G = grupo de moluscos em que as L3 foram recuperadas seguidas de número sequencial. Assim, temos: IG1, IG2, IG3; designando amostras positivas ou isoladas de larvas de metastrongilídeos correspondentes as diferentes espécies de moluscos.

Os parâmetros morfométricos foram tabulados em planilhas Microsoft Excel 2010, conforme descritos por Ash, 1970 e citados por Rocco (2007). Desta maneira, foram considerados os seguintes critérios para a obtenção das medidas:

- ✓ Comprimento total do corpo (**CTC**): linha média do corpo da larva entre as extremidades anterior e posterior;
- ✓ Largura (**L**): largura na altura da região de junção esôfago/intestino;
- ✓ Comprimento do esôfago (**CE**): linha média traçada da junção esôfago/intestino até a extremidade anterior;
- ✓ Distância do poro excretor (**DPE**): linha externa traçada do poro excretor até a extremidade anterior;
- ✓ Distância do ânus à cauda (**DAC**): linha externa traçada a partir do poro anal até a extremidade posterior;
- ✓ Tamanho do primórdio genital quando visível (**PG**): linha longitudinal da estrutura;

- ✓ Distância do primórdio genital a cauda (**PGC**): linha traçada a partir do meio do primórdio até a extremidade posterior.

A Figura 7 esquematiza os parâmetros adotados na identificação e na morfometria de larvas L3 de metastrongilídeos.

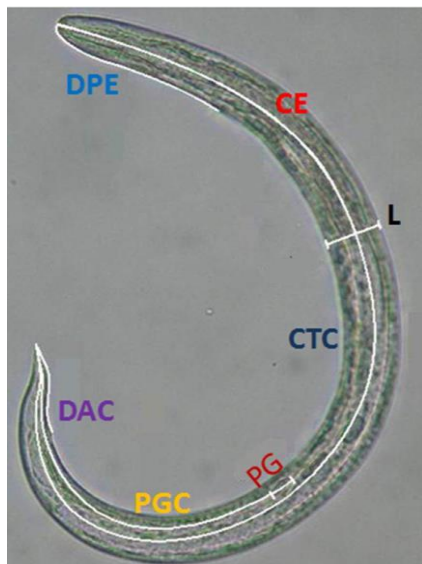


Figura 7. Parâmetros morfométricos analisados medidos em (μm) dos isolados de larvas: **CTC** (Comprimento total do corpo), **L** (largura), **CE** (Comprimento do Esôfago), **DPE** (Distância do poro excretor), **PG** (primórdio genital), **PGC** (Primórdio genital a cauda) e **DAC** (Distância do Ânus a Cauda).
Fonte: Mota DJG 2010.

Adicionalmente, 30 larvas L3 de duas cepas de referência de *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*, mantidas em modelos experimentais no Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do IAL Central, foram separadas e submetidas aos mesmos procedimentos citados anteriormente. Veja nos itens 4.7 a descrição da manutenção em laboratório do ciclo evolutivo das cepas de referências.

4.5.2 Análise de similaridade fenotípica por escore

A análise por escore foi baseada na taxonomia numérica, onde inicialmente foram estabelecidas as variações individuais das 30 larvas L3 das cepas de referência de *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis* para os parâmetros citados no item anterior e os respectivos intervalos de classe - valores mínimos e máximos (Quadro 1).

Valores morfométricos de Larvas L3 de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>							
Amostra n= 30	CTC	L	CE	DPE	DAC	PG	PGC
Valores mínimos	391,51	23,02	142,77	77,13	25,99	10,95	129,97
Valores máximos	461,64	34,42	166,66	95,15	35,38	16,00	160,86
Valores morfométricos de Larvas L3 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>							
Amostra n= 30	CTC	L	CE	DPE	DAC	PG	PGC
Valores mínimos	347,00	19,68	139,29	63,34	23,48	10,81	92,38
Valores máximos	499,71	31,01	184,08	98,52	44,43	24,33	160,86

Quadro 1 - Parâmetros morfométricos analisados medidos em (μm) das duas cepas de referências mantidas no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz utilizados nas análises por escore.

Posteriormente foram comparadas as medidas dos parâmetros correspondentes às larvas de cada isolado, com os valores mínimos e máximos conferidos as cepas de referência. Atribuiu-se escore 1 (um) quando o valor da medida estava contido dentro do intervalo de classe observado para as cepas de referência, do contrário o escore 0 (zero). Desta forma, foi constituída matriz binária correspondente aos valores coincidentes e não coincidentes. A soma dos escores obtidos (valores coincidentes) em relação ao total dos escores possíveis (100%) representou o percentual de similaridade entre as cepas de referências e os isolados. Os dados foram adicionados a uma planilha dinâmica em Excel, desenvolvida no Núcleo de Enteroparasitas, com a finalidade de otimizar a obtenção dos resultados. Como critério de diagnóstico presuntivo adotou-se o maior percentual de similaridade encontrado em comparação as duas cepas de referência. Veja exemplo na Figura 8, referente ao percentual de similaridade entre um isolado natural constituído de oito larvas e a cepa de *A. cantonensis* - IAL.

Valores de referência – Cepa *A. cantonensis*- IAL

Amostra n= 30	CTC	L	CE	DPE	DAC	PG	PGC
Valores mínimos	347,00	19,68	139,29	63,34	23,48	10,81	92,38
Valores máximos	499,71	31,01	184,08	98,52	44,43	24,33	160,86

LARVAS N=8	CTC	Escore (1/0)	L	Escore (1/0)	CE	Escore (1/0)	DPE	Escore (1/0)	DAC	Escore (1/0)	PG	Escore (1/0)	PGC	Escore (1/0)	Escores encontrados
1	498,53	1	25,92	1	176,03	1	77,53	1	41,36	1	11,6	1	149,42	1	7
2	459,41	1	25,25	1	152,95	1	80,48	1	35,85	1	11,7	1	152,58	1	7
3	457,55	1	24,9	1	164,69	1	86,48	1	41,97	1	16,01	1	159,24	1	7
4	420,33	1	22,08	1	138,74	1	74,37	1	34,15	1	10,5	1	149,06	1	7
5	458,1	1	24,23	1	167,71	1	80,02	1	40,02	1	11,54	1	162,54	0	6
6	480,97	1	24,59	1	168,18	1	80,26	1	42,2	1	13,43	1	161,26	0	6
7	480,36	1	22,53	1	172,15	1	85,15	1	41,19	1	13,79	1	164,59	0	6
8	463,79	1	23,01	1	161,74	1	73,24	1	37,73	1	13,25	1	158,59	1	7
Escores possíveis =56		8		8		8		8		8		8		5	53/56 = 94,64% de similaridade com as medidas morfométricas da cepa de referência de <i>A. cantonensis</i> do IAL.

Figura 8. Modelo de comparação do nº de escores possíveis a partir de um isolado natural de larvas (n=8) e a somatória dos escores atribuídos = escores encontrados quando comparados com valores morfométricos (µm) de uma cepa de referência mantida no IAL.

4.6 Caracterização biológica dos isolados de metastrongilídeos

4.6.1 Infecção experimental em animais

Larvas vivas em estágio L3 de metastrongilídeos obtidas de infecção natural de moluscos foram administradas por via oral por meio de sonda gástrica a animais de laboratório com o propósito de se constatar o neurotropismo das larvas (característica das larvas de *A. cantonensis*) e, de proceder ao isolamento e identificação morfológica e molecular dos parasitos (Figura 9) quando possível. Os animais utilizados nestes experimentos foram *Mesocricetus auratus* (Golden hamster) e ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*).



Figura 9. Inoculação de larvas L3 de metastrongílideo extraído a partir de lesma *Belocaulus willibaldoi* em *Mesocricetus auratus* **Fonte:** Mota DJG 2011.

A avaliação das infecções foi realizada pelo acompanhamento dos animais ao longo da infecção, seja pela pesquisa de larvas L1 nas fezes a partir do trigésimo dia após infecção ou pela pesquisa de vermes jovens e adultos em órgãos como cérebro, coração, pulmão e artérias mesentéricas após necropsia. Para a necropsia, os animais foram anestesiados com injeção, por via intramuscular, de 0,1 ml de solução de cloridrato de ketamina (100 mg/kg). Após os procedimentos anestésicos os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Para melhorar a recuperação dos nematódeos, os animais foram submetidos a sangria total pela veia cava caudal, para facilitar a observação no tecido cerebral e interior dos vasos.

Os espécimes recuperados foram lavados em solução salina fisiológica 0,87% e contados. Para a identificação morfológica os vermes foram fixados entre lâminas em solução AFA (Álcool- Formaldeído- Ácido Acético) a frio e clarificados em lactofenol. Em seguida foram fotografados com câmara digital (Cânon, PowerShot A640) acoplada ao microscópio óptico comum (Carl Zeiss, Jenaval). O software Axio Vision 4.8 foi utilizado para analisar as imagens dos espécimes obtidos. Para a identificação morfológica foram utilizados os parâmetros descritos por Maldonado Jr et al., 2010; Anderson (1978) e Chen (1935). Para identificação molecular os vermes separados foram mantidos a -20 °C até o momento do uso, seguindo protocolo descrito no item 4.6.3.

4.6.2 Capturas e procedimentos em roedores sinantrópicos para constatação de infecção natural por nematódeos

Para a investigação da infecção natural de metastrongilídeos em roedores foi realizada a captura em áreas com histórico do encontro de moluscos infectados e na ocorrência de casos humanos suspeitos de angiostrongilíase. As capturas foram realizadas com o uso de armadilhas do tipo gaiola com mola, iscadas com banana, queijo ou mandioca (Figura 10). Na impossibilidade de se capturar roedores foi realizada a coleta de fezes de roedores para busca de larvas vivas de metastrongilídeos pela técnica de Rugai.



Figura 10. Armadilha instalada em área residencial urbana do Parque Fernanda/São Paulo para captura de roedores sinantrópicos **Fonte:** Mota DJG 2011.

A constatação da infecção foi avaliada pela pesquisa de larvas L1 nas fezes e pela pesquisa de vermes jovens ou adultos utilizando o mesmo critério descrito para os animais de experimentação descrito no item 4.7, sendo realizada a busca de vermes adultos em órgãos como cérebro, coração, pulmão e artérias mesentérica após necropsia dos roedores. Eventualmente para se constatar a infecção por metastrongilídeos foi utilizado fragmentos de tecidos lesionados (pulmão, intestino) comprimido entre lâminas e observados em microscópio óptico comum.

4.6.3 Extração de DNA e análise molecular

No Laboratório de Biologia Molecular/ Centro de Parasitologia e Micologia do IAL foi realizado as análises moleculares. As amostras de larvas (L1 e L3) isoladas das fezes de roedores e de moluscos, respectivamente, assim como os vermes jovens e adultos obtidos de infecção experimental e natural em roedores foram submetidos ao processo de extração de DNA usando as instruções do KIT QIAamp DNA Mini (QIAGEN®). Cerca de 30 mg de tecido (pool de vermes ou larvas) foram macerados e adicionado 180 µl de buffer ATL. Em seguida foi adicionado 20 µl de proteinase k. Para auxiliar na ruptura, as larvas foram submetidas à agitação, com pérolas de vidro, em tissuelyser LT QIAGEN® com ciclo único de 50 oscilações/segundo durante 5 minutos.

A mistura foi incubada a 56°C até a completa lise do tecido. Depois foi adicionado 200µl de Buffer AL na amostra e submetida à agitação em vortex por 15 segundos e amostra incubada a 70°C por 10 minutos. Sendo em seguida adicionado 200 µl de etanol (96-100%) a amostra foi homogeneizada por 15 segundos. A mistura cuidadosamente foi transferida para uma coluna QIAmp Mini SPIN em seguida o tubo foi fechado e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto.

A coluna foi transferida para um novo tubo de 2 mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Foi adicionado 500 µl de Buffer AW2 a coluna e centrifugado em velocidade máxima ou 14000 rpm por 3 minutos. A coluna foi colocada em tubo de 1,5 mL e adicionado 50 µl de Buffer AE. A mistura foi incubada em temperatura ambiente de 1 a 5 minutos e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto.

O DNA extraído foi congelado a -20°C até o momento do uso. O DNA foi amplificado com os *primers* NC1(*forward*: 5'-CGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3') e NC2(*reverse*:5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'), específicos para a região ITS2 do DNAr, segundo Gasser et al. (1993) utilizando-se do kit GoTaq®Green Master Mix-Promega em termociclador Veriti®-96 Well Thermal Cycler/ Applied Biosystems nas seguintes condições, seguindo

protocolo adaptado de (Caldeira et al., 2003): desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C, 30 ciclos para: anelamento a 94 °C por 60 s, extensão a 58 °C por 60 s, desnaturação a 72 °C por 60 s e passou para a extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para as amplificações um controle negativo foi incluído em todos os experimentos.

Como controles positivos foram utilizados nas primeiras reações DNA de *A. cantonensis* proveniente do CDC de Atlanta (cepa do Havaí-EUA) e posteriormente DNA das cepas mantidas no IAL para *A. cantonensis* e *A. costaricensis* nas reações moleculares. Cinco microlitros dos produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2% com brometo de etídio utilizando-se marcadores de peso molecular Gene Ruler 100pb.

4.7 Manutenção do ciclo experimental de *A. costaricensis* e *A. cantonensis* em laboratório

Com o intuito de se obter vermes adultos e larvas L3 de *A. costaricensis* e *A. cantonensis* para o estabelecimento dos parâmetros morfométricos e padrões de DNA para as análises moleculares por PCR, os ciclos de vida destes nematóides foram mantidos em laboratório.

Angiostrongylus costaricensis, linhagem de Crissiumal/RS foi cedida pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e mantido por repiques sucessivos, no Núcleo de Enteroparasitas do IAL, em *Biomphalaria glabrata* e em *Mesocricetus auratus*.

Angiostrongylus cantonensis isolado durante a realização desta pesquisa, a partir da infecção natural de um exemplar de *Rattus norvegicus*, capturado em área urbana do Parque Fernanda, São Paulo, no ano de 2011, vem sendo mantido em *B. glabrata* e ratos albinos Wistar. A caracterização do isolado foi realizada por parâmetros morfológicos e moleculares no Núcleo de Enteroparasitas e no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos e Fungos, respectivamente. Adicionalmente, o DNA extraído foi encaminhado ao Centro de Controle de Doenças (CDC) em Atlanta, USA para confirmação da espécie.

O protocolo de manutenção das duas espécies é descrito abaixo.

4.7.1 Infecção em *B. glabrata* para obtenção de larvas L3 infectantes dos nematódeos

Hamsters infectados por *A.costaricensis* a partir do 35º dia após infecção foram colocados em gaiolas suspensas por um período de uma noite, para coleta das fezes. O mesmo procedimento foi realizado com ratos Wistar no 45º dia de infecção por *A.cantonensis*. As fezes dos animais infectados foram reunidas em único *pool*, homogeneizadas e submetidas à técnica de Rugai (Rugai *et al*, 1954) para a extração de larvas vivas L1. As larvas foram transferidas para tubos de 15 ml e concentradas por centrifugação a 2000 rpm por 1 minuto.

Após o descarte do sobrenadante, o volume foi acertado para 2 ml e uma alíquota de 10 µl foi usada para a contagem das larvas entre lâmina e lamínula em microscópio óptico comum. Cerca de 300 a 500 larvas L1 foram utilizadas para infecção de cada caramujo. Para a infecção de *B. glabrata*, os espécimes foram colocados individualmente em recipientes de vidro com tampa, medindo 30 mm de diâmetro por 39 mm de altura, contendo 3 ml de água declorada e um pedaço de alface (*Lactuca sativa*) de 2 cm² (Figura 11).

As larvas L1 foram colocadas sobre a alface e os caramujos foram mantidos nestes recipientes expostos a luz de lâmpadas incandescentes (de 60W) a uma distância de 30 cm, por 2 horas e depois mantidos a temperatura ambiente por 12 horas em vidro com tampa. Após este período os moluscos foram transferidos para aquários de 5L com água declorada, alimentados com alface por período de 30 dias, tempo exigido para o desenvolvimento larvário até o estágio L3. Foram utilizados 15 caramujos por aquário para a manutenção do ciclo evolutivo de cada espécie de *Angiostrongylus*.



Figura 11- Recipiente utilizado para infectar *B.glabrata* com larvas L1 de *A.costaricensis* / *A.cantonensis* a fim de se obter larvas L3. **Fonte:** Mota DJG 2013.

4.7.2 Infecção em hamsters e Wistar para obtenção de vermes adultos de *A. costaricensis* e de *A.cantonensis*

B. glabrata com 30 dias de infecção foram retiradas das conchas por esmagamento e cortados em pequenos fragmentos. Os tecidos foram colocados em solução aquosa contendo pepsina a 4 mg% (Sigma P-7125) e ácido clorídrico (Merck PA) 0,07% por duas horas em banho maria 37 °C. Em seguida o material digerido foi submetido à técnica de Rugai et al., 1954 para obtenção de larvas vivas (Figura 12).

As larvas L3 foram concentradas em vidro relógio com auxílio de pipeta de aspiração e separadas com auxílio de micropipeta em placa de Kline contendo água deionizada e contadas com auxílio de microscópio estereoscópico. Cerca de 10 larvas L3 de *A.costaricensis* foram administradas por via oral para cada hamster por meio de sonda esofágica.

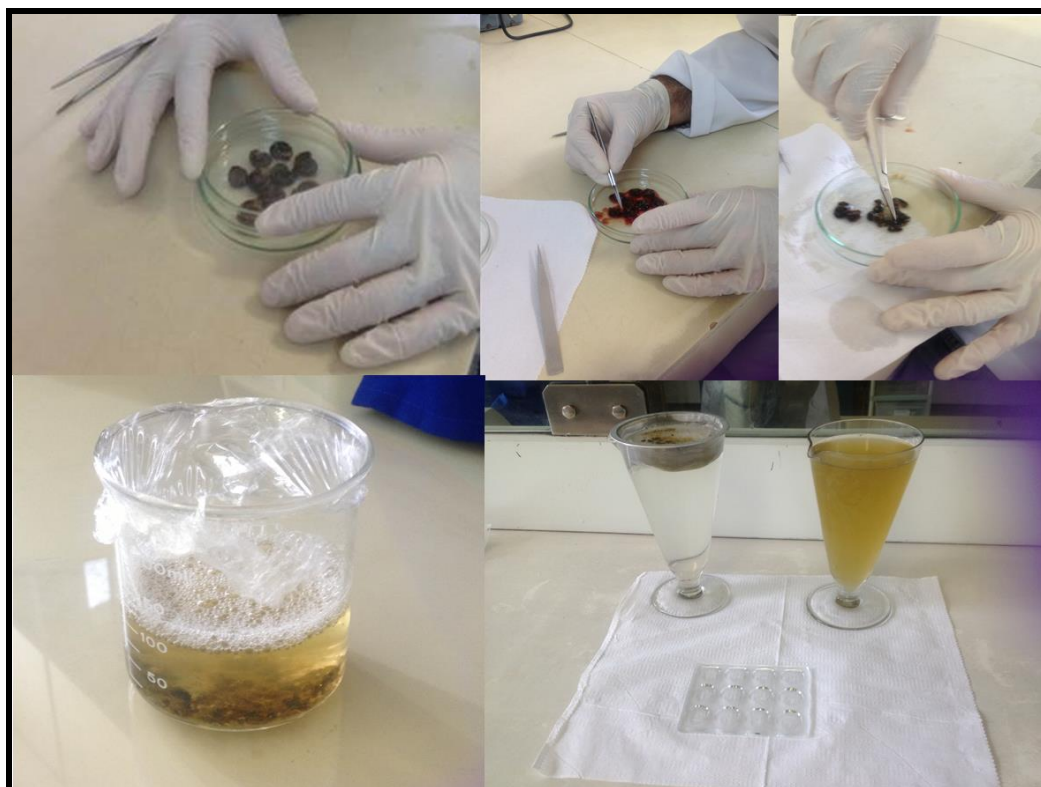


Figura 12. Método para isolamento de larvas L3 de *A.costaricensis* a partir de infecção experimental de *B. glabrata*. **Fonte:** Mota DJG 2013.

Mensalmente foram mantidos cinco hamsters infectados para a manutenção do ciclo evolutivo de *A.costaricensis*. Para manutenção do ciclo de *A.cantonensis* utilizou-se do mesmo método sendo utilizado 15 larvas L3 de *A.cantonensis* para infecção oral por roedor, sendo também utilizados cinco roedores (ratos Wistar) para manutenção do ciclo.

4.7.3 Obtenção dos vermes adultos de *A. costaricensis* e *A.cantonensis*

Espécimes adultos de *A. costaricensis* foram recuperados das artérias mesentéricas de hamsters infectados utilizados para a manutenção do ciclo evolutivo do parasito. A partir da comprovação da eliminação de larvas L1 nas fezes, os animais foram anestesiados com injeção de 0,1 ml de solução de cloridrato de Ketamina a (100 mg/kg) por via intramuscular e eutanasiados em câmara de CO₂ sendo submetidos a sangria total pela veia cava caudal.

Em seguida foi realizada perfusão porta-mesentérica com o objetivo de tornar os vermes visíveis no sistema arterial. Assim, a veia porta foi seccionada e então foi injetado no ventrículo esquerdo, solução salina fisiológica 0,87% com EDTA a 2% com auxílio de seringa. Em seguida os vermes adultos

machos e fêmeas foram removidos a partir das artérias aorta torácica, abdominal e mesentérica utilizando-se pinças e estiletos de ponta fina. Os espécimes assim recuperados foram lavados em solução salina fisiológica 0,87%, contados e mantidos a - 20 °C até o momento do uso para biologia molecular.

Os mesmos procedimentos foram utilizados após a eutanásia dos ratos Wistar infectados por *A.cantonensis*. Porém a inspeção macroscópica na busca por vermes adultos foi realizada nas artérias pulmonares e do coração dos roedores. A constatação da infecção foi avaliada pela pesquisa de larvas L1 nas fezes e pela pesquisa de vermes jovens ou adultos utilizando o mesmo critério descrito para os animais de experimentação descrito no item 4.6.1 sendo realizada a busca de vermes adultos em órgãos como cérebro, coração e pulmões para *A.cantonensis* e artérias mesentéricas para *A.costaricensis* após necropsia dos roedores.

4.8 Análise estatística

O teste Shapiro Wilk foi aplicado para verificar a distribuição das amostras. As diferenças entre três ou mais grupos foram analisadas com o teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney.

A significância foi considerada como $p < 0,05$. Essas análises foram realizadas usando o pacote SPSS 19.0 (SPSS Inc. e Predictive Analytics, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Regiões de procedência das amostras de moluscos terrestres

No período de novembro de 2008 a novembro de 2015 foram analisados 4620 espécimes de moluscos pelo Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz. Estes estavam distribuídos em 09 famílias, 14 gêneros e 15 espécies, provenientes de 15 municípios do estado de São Paulo, sendo: Bauru, Dois Córregos, Ilha Bela, Itaquaquecetuba, Jandira, Mongaguá, Monte Mor, Pindamonhangaba, Pinhalzinho, Rancharia, São Lourenço da Serra, São Paulo, São Vicente, Ubatuba e Vargem Grande Paulista. A Figura 13 mostra a distribuição regional desses municípios em relação ao estado de São Paulo.

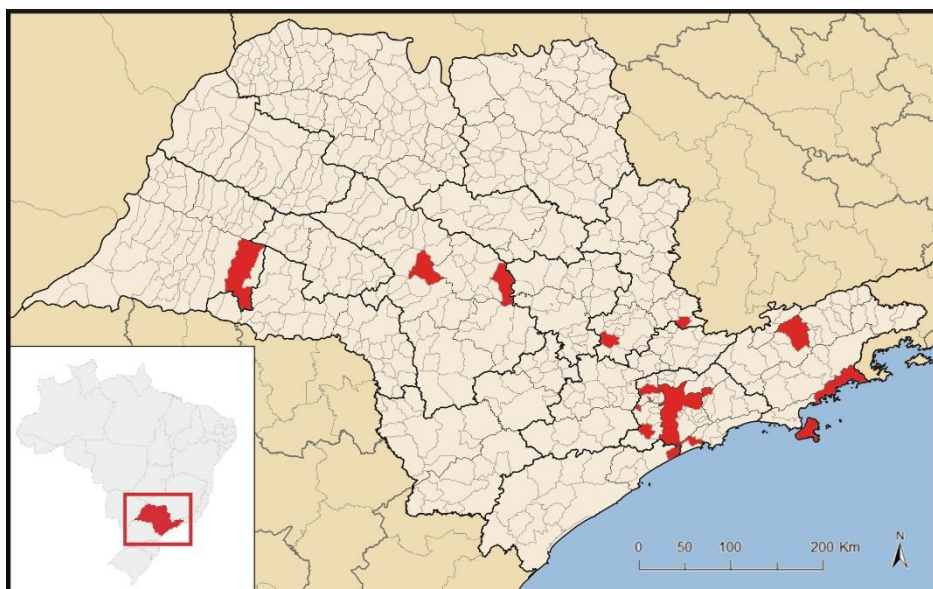


Figura 13. Mapa do estado de São Paulo com a distribuição dos 15 municípios que encaminharam amostras de moluscos terrestre para análises. **Fonte:** <http://www.saopaulo.sp.gov.br/> (Adaptado), 2017.

Os moluscos analisados foram decorrentes de 146 coletas. Destas, 65 (44,52%) coletas foram provenientes de demanda espontânea e abrangeram os demais municípios citados, com a exceção de Dois Córregos e Mongaguá. Já, as 81 (55,48%) coletas restantes foram de buscas ativas em São Paulo, Dois Córregos e Mongaguá, sendo 73 (90,12%) decorrentes de monitoramento ambiental em áreas urbanas (AAmb) e oito (9,88%) de ações de vigilância epidemiológica relacionadas a casos humanos de angiostrongilíase cerebral (CHum) (Figura 14).

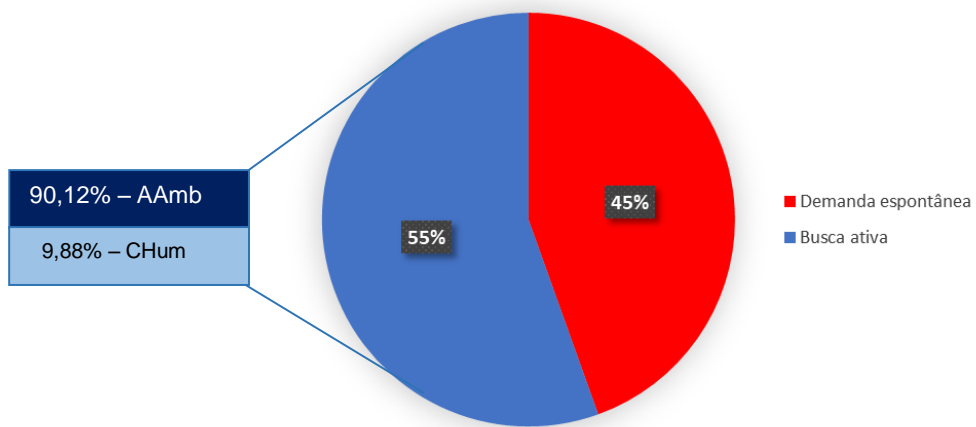


Figura 14. Distribuição geral das amostras ambientais de moluscos coletados por demandas espontâneas ou buscas ativas. **CHum:** ações de vigilância epidemiológica relacionadas a casos humanos; **AAmb:** monitoramento ambiental em áreas urbanas. **Fonte:** Mota, DJG 2018.

5.2 Moluscos terrestres coletados e identificados

Família Achatinidae

Achatina fulica (Bowdich, 1822) os moluscos identificados foram provenientes dos municípios de Bauru, Dois Córregos, Ilha Bela, Mongaguá, Pindamonhangaba, Rancharia, São Paulo, São Vicente e Vargem Grande Paulista. Dos 926 espécimes recebidos, foram utilizados 10 indivíduos para identificação específica. Estes apresentaram corpo de coloração marrom ou cinza escuro, concha cônica alongada, com variação de tamanho 40 a 125mm e diâmetro de abertura da concha entre 23 a 56mm (Figura 15).



Figura 15 A: Exemplar vivo de *Achatina fulica* proveniente do município de Bauru. **B:** Vista ventral da concha **Fonte:** Mota DJG 2008.

Além disso, foram também observados perióstraco castanho claro a escuro com faixas axiais claras irregulares, quando adultos com espira esbranquiçada. Voltas 6-8 pouco convexas. Sutura demarcada. Volta corporal desenvolvida, alongada. Abertura oval alongada. Lábio externo longo e arqueado, lábio basal curto e fortemente convexo.

Família Bradybaenidae

Bradybaena similis (Férussac, 1821) - Os moluscos coletados (1338) foram provenientes dos municípios de Bauru, Jandira, Monte Mor, São Lourenço da Serra e São Paulo. Os dez espécimes utilizados na identificação apresentaram tegumento castanho claro, concha discoide, umbilicada com variação de tamanho de 5 a 21 mm e o diâmetro de abertura da concha entre 4-15 mm, com ápice romboide (Figura 16 B). Perióstraco castanho claro uniforme ou apresentando linha escura espiral subsutural centralizada na volta corporal (Figura 16 A).

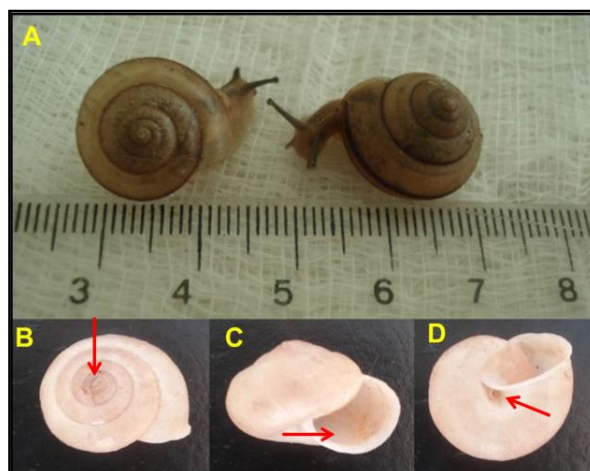


Figura 16. A - Exemplos vivos de *Bradybaena similis* coletados na zona sul de São Paulo em B, C e D conchas em diversas posições com ênfase no ápice romboide, abertura e umbílico da concha. **Fonte:** Mota DJG 2010.

Apresentando ainda voltas $5\frac{1}{4}$ - $5\frac{3}{4}$ convexas, parcialmente sobrepostas. Espira mediana, regularmente cônica. Volta corporal desenvolvida, convexa com leve angulação central. Abertura semicircular, desenvolvida, pouco mais larga do que alta. Lábio externo fortemente convexo, lábio basal longo. Columela arqueada, com a base refletida. Umbílico circular, estreito e profundo (Figura 16 D).

Família Bulimulidae

Bulimulus tenuissimus (d'Orbigny, 1835)

Os caracóis foram coletados nos municípios de Bauru, Mongaguá, Monte Mor e São Paulo, totalizando 204 espécimes. A análise de 10 indivíduos constatou variação no tamanho das conchas de 13 a 18 mm e o diâmetro de abertura das conchas entre 6,0 - 8,5mm. Concha cônica delgada, geralmente translúcida. Imperfurada. Perióstraco com coloração castanho claro com ou sem faixas axiais estriadas esbranquiçadas (Figura 17).



Figura 17. Exemplos vivos de *Bulimulus tenuissimus* em posição dorsal e ventral provenientes do bairro do Ibirapuera, São Paulo. **Fonte:** Mota DJG 2013.

Possui ainda voltas $5\frac{1}{2}$, convexas com o ápice rômbo. Sutura demarcada. Abertura semi-oval, maior do que a metade da altura total da concha. Lábio externo pouco convexo e longo, basal convexo. Columela torcida na base. Margem parietal delimitada por fina cicatriz.

Família Subulinidae

Lamellaxis goodalli (Miller, 1822) – Os moluscos foram todos coletados no bairro de Cidade Tiradentes, São Paulo. Os cinco espécimes analisados apresentaram concha cônica turriforme, com variação da concha de 3,0-13 mm e o diâmetro de abertura da concha de 0,5,- 4,0mm (Figura 18).



Figura 18. Exemplos vivos de *Lamellaxis goodalli* em posição ventral provenientes de Cidade Tiradentes, São Paulo. **Fonte:** Melo LCV 2015.

Perióstraco amarelado até branco, brilhante. Constituição frágil, translúcida. Voltas 5-6 convexas. Sutura bem demarcada, crenulada, regularmente inclinada. Espira cônica, turridiforme. Volta corporal regularmente desenvolvida, alongada. Abertura semi-oval. Lábio externo arqueado. Lábio basal curto e convexo.

Leptinaria concentrica (Reeve, 1849) - Único espécime coletado no bairro do Jaçanã, São Paulo. Apresentou concha mediana, cônica-alongada, imperfurada, 12 mm de comprimento e diâmetro de abertura da concha de 5,0mm. Perióstraco amarelo brilhante. Voltas 5½ regularmente convexas. Sutura bem demarcada, inclinada. Espira cônica com voltas amplas. Volta corporal desenvolvida, alongada e convexa. Abertura semi-oval alongada. Lábio externo longo e arqueado. Lábio basal convexo, oblíquo, formando uma pequena carena no contato com a columela (Figura 19).

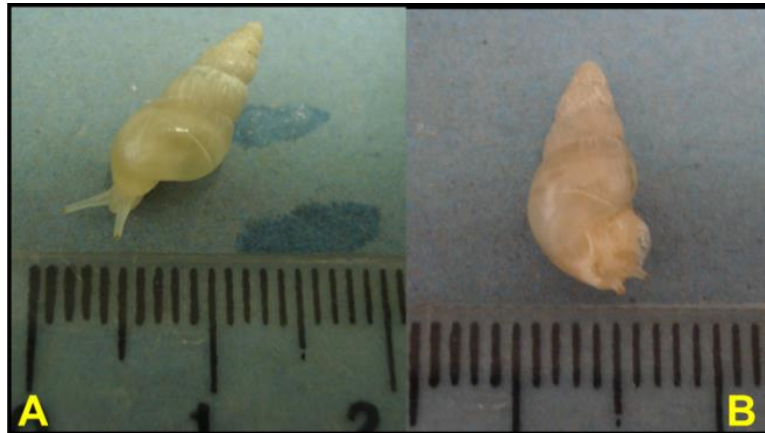


Figura 19 - **A**- Exemplar vivo de *Leptinaria concentrica* em posição dorsal e em **B** vista ventral do molusco proveniente do bairro do Jaçanã, São Paulo. **Fonte:** Mota DJG 2013.

Rumina decollata (Linneaus, 1758) - Todos os caracóis desta espécie coletados (817) foram do município de São Paulo. Os dez indivíduos analisados apresentaram tegumento enegrecido, cinzento ou marrom, concha mediana, turridiforme, umbilicada com variação no tamanho de 23 a 45mm e o diâmetro de abertura da concha entre 8,0-12mm .Perióstraco castanho claro (Figura 20).



Figura 20. **A**- Exemplar vivo de *Rumina decollata*; **B**- conchas com vista ventral e dorsal coletados no município de São Paulo. **Fonte:** Mota DJG 2011.

Apresentaram ainda volta corporal regularmente desenvolvida-alongada, voltas 4-7 retilíneas, espira turridiforme, parcialmente quebrada. Abertura pequena, semi-oval. Lábio externo convexo formando um arco contínuo com o lábio basal. Columela curta, retilínea e refletida. Umbílico formado por um pequeno orifício na base da columela.

Subulina octona (Bruguière, 1789) - Os cinco caracóis analisados foram coletados do município de Bauru. Quando vivo o animal apresenta tegumento amarelo. Possui concha cônica-turridiforme, alongada, imperfurada, conchas com variação no tamanho de 12 a 16mm e o diâmetro de abertura da concha entre 3,5 a 4,0mm (Figura 21) com perióstraco esbranquiçado, translúcido e brilhante.



Figura 21 - Exemplar fixado de *Subulina octona* com vista ventral (A) e dorsal (B) proveniente do município Bauru. **Fonte:** Mota DJG 2012.

As conchas apresentaram de oito a nove voltas convexas. Sutura demarcada, acentuadamente inclinada e regular com ápice romboide. Abertura semi-oval, pequena. Lábio externo pouco arqueado e lábio basal convexo e curto. Columela curta, levemente arqueada e refletida internamente, com a base truncada.

Família Systrophiidae

Prohappia besckei (Dunker, 1847) - Um total de 88 moluscos foram coletados no bairro de Cidade Tiradentes - São Paulo. Os cinco espécimes analisados apresentaram concha deprimida cônica, convexa, frágil, umbilicada variação de tamanho da concha de 4,0-5,0mm e com diâmetro de abertura da concha de 5,0- 6,0mm. Perióstraco amarelado, translúcido. Voltas 4½-5 retilíneas, sem convexidade. Sutura superficial. Volta corporal desenvolvida, com laterais arqueadas. Abertura semicircular, ampla. Lábio externo formando um arco contínuo com o lábio basal. Columela longa e arqueada. Perístoma delgado. Margem parietal convexa e longa, formada pela porção interna da volta corporal. Umbílico largo e profundo (Figura 22).



Figura 22. Concha de *Prohappia besckei* em diversas posições coletada em Cidade Tiradentes, São Paulo. **Fonte:** Melo LCV e Mota DJG 2015.

Família Agriolimacidae

Deroceras laeve (Muller, 1774) - Foram coletadas 295 lesmas no município de São Paulo, oito no município de Pinhalzinho e quatro no município de São Lourenço da Serra. Os exemplares analisados (n=10) apresentaram corpo cilíndrico pequeno, comprimento variando de 10 a 25mm, com a parte mediana mais alta que o restante do corpo, noto delgado e frágil; coloração castanha escura uniformemente distribuída (Figura 23).



Figura 23 - Espécime vivo de *Deroceras laeve* coletada na zona sul São Paulo. **Fonte:** Mota DJG 2011.

Dorso com partes distintas; porção anterior curta, com estrias longitudinais delgadas; porção mediana mais alta e larga com o manto

bastante desenvolvido formando uma corcova; porção posterior com rugas dispostas longitudinalmente. Gonóporo localizado atrás do tentáculo direito. Quando presente o pênis era alongado, anteriormente dilatado, posteriormente vermiforme, com inclinação irregular. Pneumóstoma com abertura do lado direito do corpo na parte média anterior. Sola pediosa desenvolvida.

Família Limacidae

Limacus flavus (Linnaeus, 1758) - Os 23 exemplares coletados foram do município de São Paulo apresentaram variação corporal (60-100 mm) de comprimento, dorso arredondado, com extremidade traseira carenada e muito curta. A coloração do corpo cinza-amarelado, com manchas esverdeadas nítidas e tentáculos azulados (Figura 24).



Figura 24 - Espécime vivo de *Limacus flavus* coletada na zona sul São Paulo. **Fonte:** Mota DJG, 2010.

Sola de cor amarela pálida, assim como seu muco. O orifício genital imediatamente posterior ao omatóforo direito. Possui concha interna sob a região posterior do manto, não saliente. Pneumóstoma com abertura do lado direito do corpo na parte média anterior do manto, o pênis é longo e tem duas a três dobras, e o duto da espermateca se une ao ápice do oviduto.

Família Philomycidae

Meghimatium pictum (Stoliczka, 1873) - As lesmas coletadas foram provenientes dos municípios de São Lourenço da Serra e São Paulo, totalizando 11 espécimes. Os animais analisados (02) apresentaram corpo

cilíndrico (36 e 40 mm), alongado com a parte anterior arredondada e a parte posterior afilada. Tegumento delicado, carnoso, coloração castanha clara ou amarelada com um par de linhas laterais longitudinais escuras, uma de cada lado do corpo e outra mais clara na porção médio dorsal. Cabeça alongada, estendida para fora da cavidade do manto. Pontuação irregular também cobre o corpo em tonalidade mais clara do que as linhas. Dorso quase tão alto quanto largo; extremidade anterior arredondada e posterior com afilamento brusco (Figura 25). Vasos deferentes curtos, só um pouco mais longos que o pênis. Pênis retorcido, curto, ligeiramente mais longo que o átrio. Espermateca quase esférica, seu duto fino. Átrio grande, em forma de barril.



Figura 25. **A** - Vista dorsal de exemplar vivo de *Meghimatium pictum* provenientes do município de São Paulo e em **B** – Espécimes vivos de *M. pictum* coletados em São Lourenço da Serra.
Fonte: Mota DJG, 2013.

Família Veronicellidae

Belocaulus willibaldoi (Ohlweiler, Mota e Gomes, 2009) - A maioria dos espécimes (n=219) de *B. willibaldoi* coletadas foi do município de São Paulo, além de seis espécimes no município de Pinhalzinho e três espécimes de São Lourenço da Serra. As lesmas analisadas (10) apresentaram tamanho do corpo com variação de 48 a 62mm. O notopresentou coloração que variou de marrom claro ao castanho acinzentado, com manchas ligeiramente escuras ou fortemente negras, geralmente dispersas. O hiponoto e a sola de cor bege.

Sola estreita ultrapassando o limite posterior do corpo quando o animal está em movimento (Figura 30).

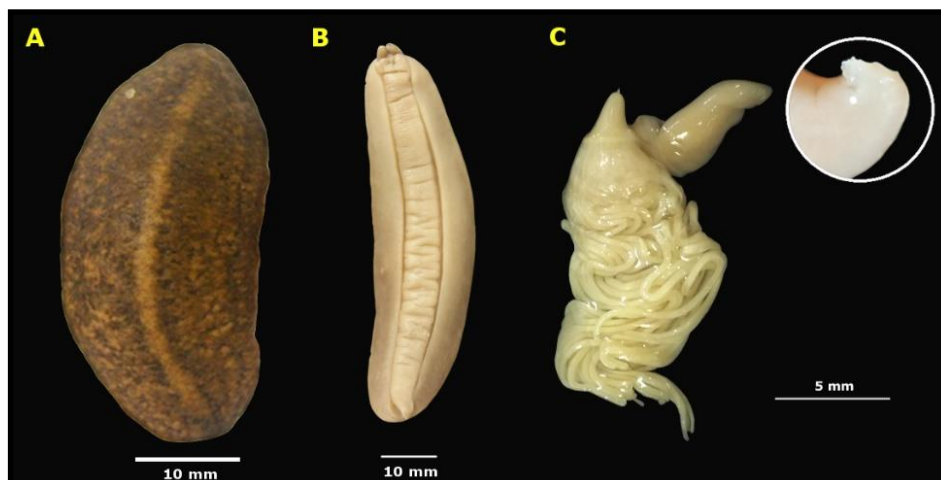


Figura 26- Espécime de *Belocaulus willibaldoi* coletados e em área residencial no Bairro Parque Fernanda, São Paulo. **A:** dorso (noto); **B:** ventre; (sola e hiponotos). **C:** órgão reprodutor masculino/destaque para extremidade da glânde com digitações (tubérculos). **Fonte:** Melo LCV e Mota DJG 2011.

O poro genital feminino está localizado ventralmente, na metade posterior da hiponoto direito, enquanto o poro genital masculino situa-se na região anterior, no âmbito do tentáculo inferior direito. Possui pequenas projeções semelhantes aos tubérculos na região anterior da glânde (Ver detalhe Figura 26 C). Estes se mostraram desiguais ou dispostos em linhas e na extremidade encontraram-se de maneira desordenada. A glânde apresenta uma região basal alargada e estreita-se para a extremidade, terminando em uma margem digitiforme. A base do pênis é curta e mal definida. A glândula acessória está completamente inserida no tegumento.

Sarasinula linguaeformis (Semper, 1885)- Foram coletadas 634 lesmas, sendo a maioria proveniente do município de São Paulo, além de exemplares coletados nos municípios de Bauru, Monte Mor e Pinhalzinho. Os dez espécimes analisados apresentaram variação de tamanho entre 56-62mm de comprimento. A ornamentação do noto, hiponoto e sola com aspecto negro marmorado (Figura 27).



Figura 27. A- Espécimes vivos de *Sarasinula linguaeformis* coletados no município de São Paulo e em **B-** vista ventral da lesma com destaque para coloração negra da sola e hiponotos.
Fonte: Moysés,E e Mota DJG 2009

A espécie se diferencia pelas demais do gênero pelas características do pênis e da glândula peniana. Apresenta genitália mais desenvolvida. A glândula do pênis é alongada e afilada distalmente, assumindo aspecto de seta. A glândula peniana apresentou túbulos serpenteantes na base, em geral em número de 12 a 18 túbulos.

Phyllocaulis boraceiensis Thomé, 1972 - Os espécimes analisados (n=26) foram coletados no município de São Paulo e Mongaguá. Para identificação específica se utilizou 03 espécimes. As lesmas analisadas apresentaram corpo desenvolvido, comprido e largo (70-180mm) com tegumento espesso, coloração uniforme, castanho claro a escuro com pontuação dorsal, granulada e áspera. Cabeça não diferenciada do resto do corpo encoberta pelo tegumento que forma uma cavidade para retração; Omatóforos superiores três vezes o tamanho dos inferiores; ambos escurecidos. Dorso quase tão alto quanto largo; extremidade anterior arredondada e posterior com afilamento brusco (Figura 28).



Figura 28- Exemplar vivo de *Phyllocaulis boraceinsis* coletado no município de São Paulo.
Fonte: Moysés E 2009.

Apresentaram ainda sola pediosa central, desenvolvida; destacando-se em relação ao hiponoto, com linha ventral; coloração mais clara do que o noto, com linhas transversais. Hiponoto direito e esquerdo presente, relativamente com a mesma largura da sola pediosa. Muco com coloração laranjada. Pênis constituído de espata com minúsculos espinhos no lado interno de contato com a glândula.

Phyllocaulis variegatus (Semper, 1885) - As lesmas coletadas foram provenientes de Itaquaquecetuba e do município de São Paulo. Apresentaram padrão de ornamentação bastante variado com relação à pigmentação do noto. Os três espécimes analisados apresentaram variação de tamanho (56-76 mm) de comprimento. A coloração do noto variou desde marrom claro até marrom escuro, com diferentes desenhos no noto. Sola alargada se comparada com outras espécies do gênero (Figura 29).



Figura 29. Espécime vivo de *Phyllocaulis variegatus* coletado em Itaquaquecetuba- SP com seta indicando a sola. **Fonte:** Mota DJG 2012.

O pênis apresenta glândula cilíndrica, achatada lateralmente, com borda terminal denteada, espata laminar com borda serrilhada e extremidade livre em semicírculo.

5.3 Distribuição de moluscos identificados segundo a espécie

Dentre as espécies de caracóis, os maiores percentuais coletados foram de *Bradybaena similaris* (27,32%), *Rumina decollata* (20%) e *Achatina fulica* (19,55%). Entre as lesmas, as espécies mais coletadas foram *Sarasinula linguaeformis* (14%), seguida por *Deroceras laeve* (6,36%) e *Belocaulus willibaldoi* (4,92%). O número de espécies identificadas e o percentual de moluscos coletados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Número absoluto e relativo de espécies de moluscos coletados no período de novembro de 2008 a novembro de 2015 em 15 municípios do Estado de São Paulo.

Espécies coletadas	n	%
<i>Bradybaena similaris</i>	1338	27,32
<i>Achatina fulica</i>	926	20,00
<i>Rumina decollata</i>	817	19,55
<i>Sarasinula linguaeformis</i>	634	14,00
<i>Deroceras laeve</i>	307	6,36
<i>Belocaulus willibaldoi</i>	228	4,92
<i>Bulimulus tenuissimus</i>	204	4,40
<i>Prohappia besckei</i>	88	1,90
<i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	26	0,58
<i>Limacus flavus</i>	23	0,49
<i>Meghimatium pictum</i>	11	0,20
<i>Lamellaxis goodalli</i>	9	0,12
<i>Subulina octona</i>	5	0,10
<i>Phyllocaulis variegatus</i>	3	0,05
<i>Leptinaria concentrica</i>	1	0,01
Total	4620	100

5.4 Distribuição de moluscos identificados segundo município

Os municípios com as maiores frequências de moluscos analisados foram: São Paulo (80,86%) e Bauru (12,06%), conforme descrito na Tabela 2. Onde as espécies de maior ocorrência foram: *B. similaris*, *R. decollata* e *S. linguaeformis*, que juntas somaram 73,21% da amostragem de São Paulo e *A. fulica* 96,09% de Bauru.

Tabela 2. Distribuição da porcentagem de moluscos coletados por municípios, segundo as espécies.

Município	Espécies	n (% no município)	% do total	
São Paulo	<i>Bradybaena similaris</i>	1293 (34,66)	3730 (80,74)	
	<i>Rumina decollata</i>	817 (21,90)		
	<i>Sarsinula linguaeformis</i>	621 (16,65)		
	<i>Deroceras laeve</i>	295 (7,91)		
	<i>Belocaulus willibaldoi</i>	219 (5,87)		
	<i>Bulimulus tenuissimus</i>	200 (5,36)		
	<i>Achatina fulica</i>	135 (3,62)		
	<i>Prohappia besckei</i>	88 (2,36)		
	<i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	25 (0,67)		
	<i>Limacus flavus</i>	23 (0,62)		
	<i>Lamellaxis goodalli</i>	9 (0,24)		
	<i>Meghimatium pictum</i>	2 (0,05)		
	<i>Phyllocaulis variegatus</i>	2 (0,05)		
	<i>Leptinaria concentrica</i>	1 (0,03)		
Bauru	<i>Achatina fulica</i>	540 (96,09)	562 (12,16)	
	<i>Sarsinula linguaeformis</i>	11 (1,96)		
	<i>Bradybaena similaris</i>	5 (0,89)		
	<i>Subulina octona</i>	5 (0,89)		
	<i>Bulimulus tenuissimus</i>	1 (0,18)		
Pindamonhangaba	<i>Achatina fulica</i>	68 (100)	68 (1,47)	
São Vicente	<i>Achatina fulica</i>	62 (100)	62 (1,34)	
Ubatuba	<i>Achatina fulica</i>	54 (100)	54 (1,17)	
Pinhalzinho	<i>Bradybaena similaris</i>	24 (61,54)	39 (0,84)	
	<i>Deroceras laeve</i>	8 (20,51)		
	<i>Belocaulus willibaldoi</i>	6 (15,38)		
	<i>Sarsinula linguaeformis</i>	1 (2,56)		
Mongaguá	<i>Achatina fulica</i>	20 (86,96)	23 (0,50)	
	<i>Bulimulus tenuissimus</i>	2 (8,70)		
	<i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	1 (4,35)		
Rancharia	<i>Achatina fulica</i>	18 (100)	18 (0,39)	
Vargem Grande Paulista	<i>Achatina fulica</i>	18 (100)	18 (0,39)	
São Lourenço da Serra	<i>Meghimatium pictum</i>	9 (52,94)	17 (0,37)	
	<i>Deroceras laeve</i>	4 (23,53)		
	<i>Belocaulus willibaldoi</i>	3 (17,65)		
	<i>Bradybaena similaris</i>	1 (5,88)		
Jandira	<i>Bradybaena similaris</i>	9 (100,00)	9 (0,19)	
Ilha Bela	<i>Achatina fulica</i>	8 (100,00)	8 (0,17)	
Monte Mor	<i>Bradybaena similaris</i>	6 (75,00)	8 (0,17)	
	<i>Bulimulus tenuissimus</i>	1 (12,50)		
	<i>Sarsinula linguaeformis</i>	1 (12,50)		
Dois Córregos	<i>Achatina fulica</i>	3 (100)	3 (0,06)	
Itaquaquecetuba	<i>Phyllocaulis variegatus</i>	1 (100)	1 (0,02)	
Total	15 municípios	15 espécies	4620 (100)	4620 (100)

Obs: Não efetuado cálculo do percentual total, uma vez que os valores foram distribuídos por município.

Dos 4620 moluscos analisados, foram utilizados 84 espécimes para a identificação em nível de espécie, o que correspondeu a 1,82%, conforme Tabela 3. Assim, foi encaminhado para exames parasitológicos um total de 4536 espécimes.

Tabela 3. Porcentagem de moluscos utilizados para identificação das espécies e número de espécimes analisados para infecção natural de metastrongilídeos.

Espécies coletadas	n	fixadas	%	analisados	
<i>Bradybaena similaris</i>	1338	10	0,75	1328	
<i>Achatina fulica</i>	926	10	1,08	916	
<i>Rumina decollata</i>	817	10	1,22	807	
<i>Sarasinula linguaeformis</i>	634	10	1,58	624	
<i>Deroceras laeve</i>	307	10	3,26	297	
<i>Belocaulus willibaldoi</i>	228	10	4,39	218	
<i>Bulimulus tenuissimus</i>	204	10	4,90	194	
<i>Prohappia besckei</i>	88	5	5,68	83	
<i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	26	3	11,54	23	
<i>Limacus flavus</i>	23	3	13,04	20	
<i>Meghimatium pictum</i>	11	2	18,18	9	
<i>Lamellaxis goodalli</i>	9	0	0,00	9	
<i>Subulina octona</i>	5	1	20,00	4	
<i>Phyllocaulis variegatus</i>	3	0	0,00	3	
<i>Leptinaria concentrica</i>	1	0	0,00	1	
Total espécies	15	4620	84	1,82	4536

5.5 Análises parasitológicas em moluscos terrestres

5.5.1. Caracterização das amostras de metastrongilídeos

Os 4536 espécimes encaminhados para exames parasitológicos geraram 146 amostras (*pools*) por espécie, sendo 85 (58,23%) com resultados negativos e 61 (41,78%) apresentaram infecção natural por larvas de nematódeos.

De acordo com as características morfológicas das larvas L3, em 32/61 (52,46%) das amostras positivas foram obtidas apenas larvas de metastrongilídeos; em 25/61 (40,98%) apresentaram, exclusivamente, larvas

de outros nematódeos sem interesse médico-veterinário e 4/61 (6,56%) amostras estavam positivas tanto com larvas de metastrongilídeos, quando de outros nematódeos (infecção mista). Assim, foram selecionadas 36 (59,02%) amostras com relevância para o estudo.

A Tabela 4 demonstra a distribuição das amostras positivas para larvas de metastrongilídeos segundo a espécie de molusco, sendo que *B. similaris* teve a maior representação nas coletas, porém com a positividade de 3,13%, seguida de *A. fulica*, com 23 amostras sendo 43,78% positivas.

Tabela 4. Amostras positivas para larvas de metastrongilídeos de interesse médico/veterinário distribuídas por espécies de molusco.

Espécie hospedeira	n	Amostras examinadas	Amostras positivas	%
<i>Bradybaena similaris</i>	1328	32	1	3,13
<i>Achatina fulica</i>	916	23	10	43,78
<i>Rumina decollata</i>	807	10	3	30,00
<i>Sarasinula linguaeformis</i>	624	20	7	35,00
<i>Deroceras laeve</i>	297	20	4	20,00
<i>Belocaulus willibaldoi</i>	218	17	5	29,41
<i>Bulimulus tenuissimus</i>	194	4	0	0,00
<i>Prohappia besckei</i>	83	2	1	50,00
<i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	23	3	1	33,33
<i>Limacus flavus</i>	20	6	1	16,67
<i>Meghimatium pictum</i>	9	2	0	0,00
<i>Lamellaxis goodalli</i>	9	2	1	50,00
<i>Subulina octona</i>	4	1	0	0,00
<i>Phyllocaulis variegatus</i>	3	3	1	33,33
<i>Leptinaria concentrica</i>	1	1	1	100,00
Total espécies 15	4536	146	36	24,66

5.5.2. Análises morfológicas das larvas de metastrongilídeos por amostra

Durante as análises morfológicas foram encontradas larvas de metastrongilídeos com três tipos de caudas: cauda com a presença do quinóbio (botão) na porção terminal, característica que sugere a definição da

espécie como *Aelurostrongylus abstrusus* (Figura 30A). Estas foram encontradas em L3 extraídas de cinco (13,89%) amostras; cauda curta e pontiaguda, sugestiva de *Angiostrongylus* spp. (Figura 30B), encontrada em 28 amostras (77,78%); e cauda cônica retorcida encontrada em três amostras (8,33%). Larvas com esse terceiro tipo de cauda foram consideradas como “não identificadas” (Figura 30C).

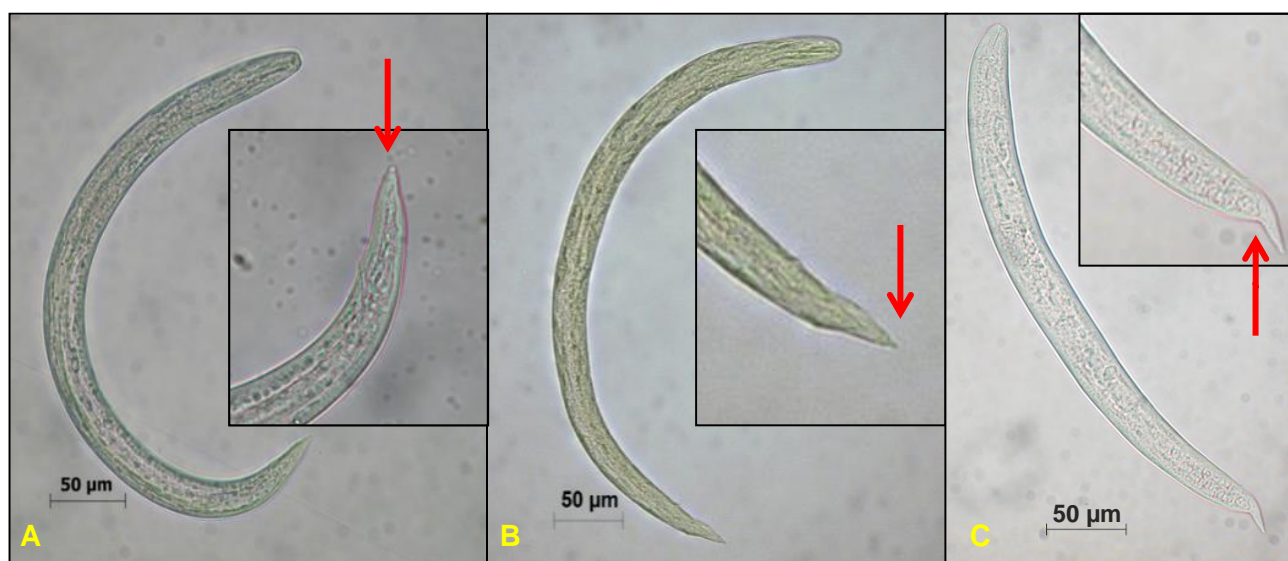


Figura 30. Morfologia das larvas L3 isoladas dos moluscos: **A:** larva sugestiva de *Aelurostrongylus abstrusus*, detalhe da cauda com quinóbio; **B:** sugestiva de *Angiostrongylus* spp., detalhe da cauda pontiaguda; **C:** larva não identificada, detalhe da cauda cônica e retorcida. **Fonte:** Mota DJG e Melo LCV 2015.

5.5.3. Análises morfométricas das larvas dos isolados de referência: *Angiostrongylus costaricensis* e *A. cantonensis*.

O resultado descritivo das análises morfométricas das 30 larvas L3 dos isolados de referência de *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*, mantidas em modelos experimentais no IAL Central, estão expressas nas Tabelas 5 e 6. O teste estatístico *Mann-Whitney* efetuado para comparações dos isolados, descrito na Figura 31, demonstrou que as variáveis que distinguem as espécies são: CTC ($p < 0,001$), L ($p < 0,001$), CE ($p < 0,001$), DAC

($p < 0,001$), DPG ($p = 0,004$) e PG ($p = 0,002$), enquanto que somente DPE ($p = 0,355$) demonstra similaridade entre os isolados de referência.

Tabela 5. Morfometria das larvas L3 de *Angiostrongylus costaricensis* isoladas de *Biomphalaria glabrata* mantidas no Instituto Adolfo Lutz.

Grupo	Espécie	Larvas (n)	Variáveis	Média	± DP	Intervalo de Variação
Isolado de referência	<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	30	CTC	429,27	19,35	391,51-461,64
			L	26,96	2,53	23,02-34,42
			CE	152,19	6,11	142,77-166,66
			DPE	85,24	4,30	77,13-95,15
			DAC	30,26	2,51	25,99-35,38
			DPG	146,75	9,88	129,97-160,86
			PG	14,15	1,26	10,95-16,00

Tabela 6. Morfometria das larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* isoladas de *Biomphalaria glabrata* mantidas no Instituto Adolfo Lutz.

Grupo	Espécie	Larvas (n)	Variáveis	Média	± DP	Intervalo de Variação
Isolado de referência	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	30	CTC	457,29	23,65	347,00-499,71
			L	23,57	2,14	19,68-31,01
			CE	166,10	8,34	139,29-184,08
			DPE	82,95	8,10	63,34-98,42
			DAC	36,75	4,75	23,48-44,43
			DPG	154,16	21,88	92,38-196,15
			PG	15,54	2,40	10,81-24,33

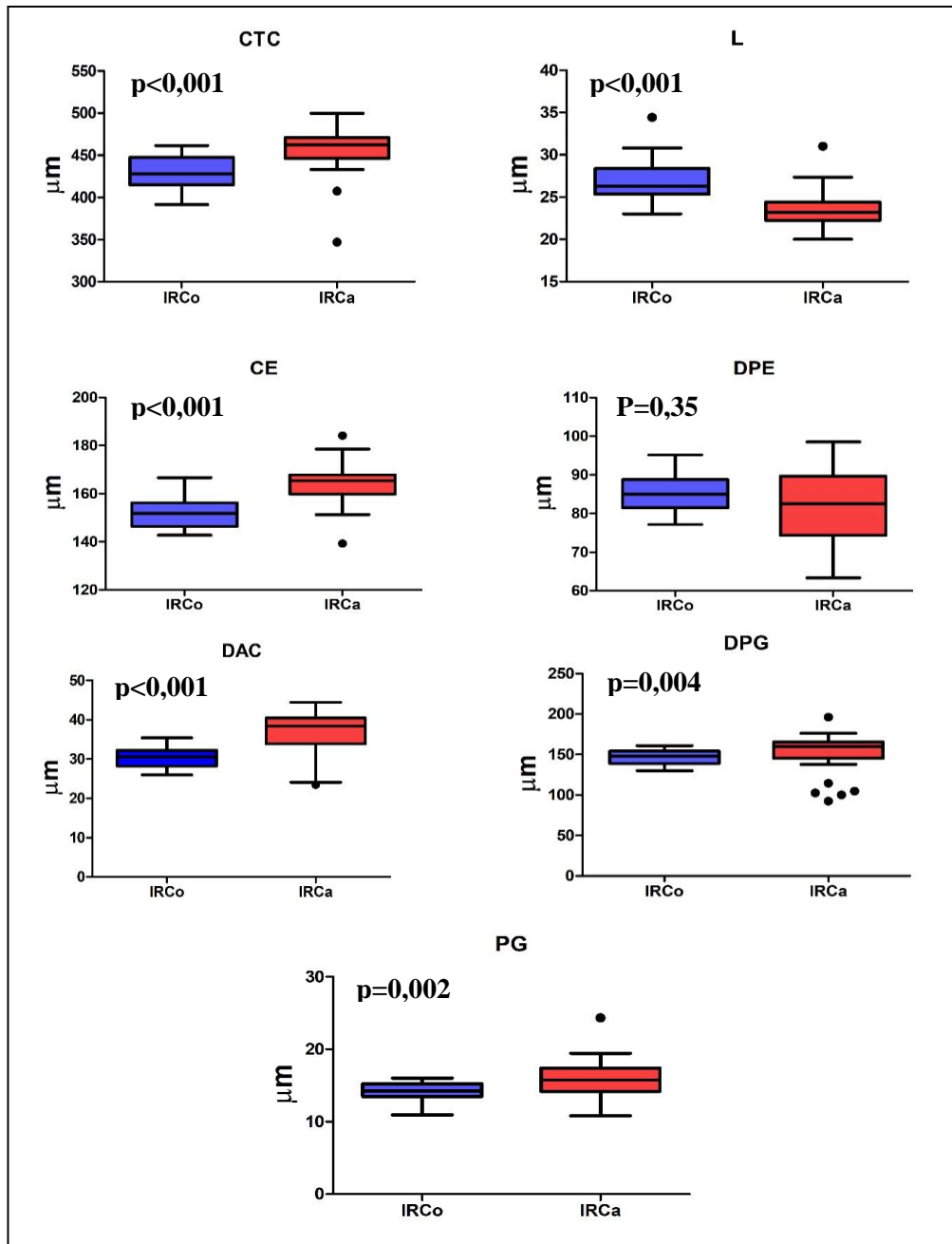


Figura 31. Análise estatística por *Mann-Whitney* das variáveis morfométricas para comparação entre os isolados de referências: **IRC_o** (*A.costaricensis*) e **IRC_a** (*A.cantonensis*). **CTC**: comprimento total do corpo; **L**: largura; **CE**: comprimento do esôfago; **DPE**: distância do poro excretor; **DAC**: distância do ânus a cauda; **DPG**: distância do primórdio genital; e **PG**: comprimento do primórdio genital.

5.5.4 Análises morfométricas das larvas de metastrongilídeos por amostra.

As análises morfométricas das larvas extraídas dos moluscos estão expressas nas Tabelas de 1 a 32 (anexo 5-15) onde é possível observar a

média, o desvio padrão e as medidas mínimas e máximas das variáveis observadas nos três grupos que foram separados, segundo suas caudas, pelas análises morfológicas apresentadas no item 5.5.2. Dos 28 grupos classificados com larvas de *Angiostrongylus* spp. em 25 foram efetuadas as análises morfométricas (anexo 5 a 13). Por outro lado, dos cinco grupos contendo larvas de *Aelurostrongylus abstrusus*, em quatro foram efetuadas as análises (anexos 13 e 14). Já, no grupo de larvas de metastrongilídeos “não identificadas”, as análises morfométricas foram realizadas em três grupos (anexos 14 e 15).

Destaca-se ainda, que dos grupos classificados como *Angiostrongylus* spp, as 423 larvas L3 utilizadas nas análises morfométricas foram provenientes do isolamento de 11 hospedeiros intermediários: *A. fulica*, *B. willibaldoi*, *B. similaris*, *D. laeve*, *L. concentrica*, *L. flavus*, *L. goodalli*, *P. besckei*, *P. variegatus*, *R. decollata* e *S. linguaeformis*. Já as 94 larvas semelhantes a *A. abstrusus* foram isoladas exclusivamente de *A. fulica*, assim como as 51 larvas que não foram identificadas as espécies. Os dados morfométricos condensados dos três grupos de larvas analisadas estão expressos nas tabelas 7 a 9.

Tabela 7. Morfometria de 423 larvas L3 sugestivas de *Angiostrongylus* spp isolados de 11 espécies de moluscos terrestres do município de São Paulo e Itaquaquecetuba no período de novembro de 2008 a novembro de 2015.

Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
<i>Angiostrongylus</i> spp.	423	CTC	447,00	45,01	338,22-564,54
		L	24,65	2,91	18,27-38,76
		CE	164	15,97	126,03- 207,73
		DPE	83,80	10,57	56,36-107,39
		DAC	36,69	4,52	24,13-50,39
		DPG	159,55	19,09	98,58-202,19
		PG	12,93	2,4	7,25- 22,15

Tabela 8. Morfometria de 94 larvas L3 sugestivas de *Aelurostrongylus abstrusus* isolados de *Achatina fulica* dos municípios de Bauru e Mongaguá no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2012.

Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	94	CTC	478,50	76,58	342,97- 631,49
		L	24,26	4,65	16,21-36,21
		CE	185,86	32,65	116,43-318,77
		DPE	86,87	15,21	58,51-142,50
		DAC	32,20	6,22	20,31-53,91
		DPG	158,79	23,12	112,14-204,50
		PG	10,05	2,09	5,28-14,69

Tabela 9. Morfometria de 51 larvas L3 sugestivas de espécie não identificada isolados de *Achatina fulica* de três bairros de Bauru em fevereiro de 2012.

Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
Não identificada	51	CTC	397,56	75,62	280,55-541,75
		L	26,62	8,08	15,70-39,78
		CE	135,75	20,73	65,29- 199,86
		DPE	63,94	5,88	59,02-101,78
		DAC	29,89	3,51	21,33- 41,40
		DPG	131,14	19,82	97,28-173,56
		PG	12,53	3,54	7,67- 26,23

5.5.5. Análise de similaridade fenotípica por escore

Ao serem comparadas as variáveis individualmente de cada larva dos isolados ambientais com as dos isolados de referência, conforme exemplificado no anexo 1, foram obtidas as respectivas porcentagens de similaridade fenotípica dos grupos, conforme quadro 2.

O quadro 2 demonstra também que todos os grupos que estavam compatíveis com *Angiostrongylus* spp. de acordo com as análises morfológicas, apresentaram porcentagem de similaridade maior para o isolado de referência de *A. cantonensis* quando comparados com o de *A. costaricensis*, as quais variaram de 42,96% a 98,57% e 0,00% a 77,62%, respectivamente.

Por outro lado, os grupos que apresentaram morfologia compatível com *A. abstrusus* não demonstraram porcentagens elevadas, independente da espécie com a qual foram comparadas, sendo que estas variaram de 57,14% a 63,81% para *A. cantonensis* e 28,10% a 48,57% para *A. costaricensis*. Os grupos não identificados, suas porcentagens variaram de 33,83% a 82,38% e 12,03% a 62,86%, respectivamente.

Quadro 2 - Resultado das análises por escore dos isolados das infecções naturais comparados com os isolados de referência (IR)

Isolado	resultado sugestivo (morfologia)	comparativos com IR (%)		Isolado	resultado sugestivo (morfologia)	comparativos com IR (%)	
		<i>A. cantonensis</i>	<i>A. costaricensis</i>			<i>A. cantonensis</i>	<i>A. costaricensis</i>
IG1	<i>A.abstrusus</i>	63,81	28,10	IG17	<i>Angiostrongylus</i> spp.	94,96	69,75
IG2	<i>A.abstrusus</i>	57,67	34,92	IG18	<i>Angiostrongylus</i> spp.	71,43	0,00
IG3	<i>Angiostrongylus</i> spp.	91,90	63,81	IG19	<i>Angiostrongylus</i> spp.	89,61	60,39
IG4	<i>Angiostrongylus</i> spp.	94,90	53,57	IG20	<i>Angiostrongylus</i> spp.	87,76	63,27
IG5	<i>Angiostrongylus</i> spp.	98,57	77,62	IG21	<i>Angiostrongylus</i> spp.	42,86	21,43
IG6	<i>Angiostrongylus</i> spp.	88,89	57,14	IG22	Não identificado	**	**
IG7	<i>Angiostrongylus</i> spp.	88,78	39,80	IG23	Não identificado	**	**
IG8	<i>Angiostrongylus</i> spp.	89,29	50,00	IG24	<i>Angiostrongylus</i> spp.	85,71	57,14
IG9	<i>Angiostrongylus</i> spp.	94,71	66,67	IG25	<i>Angiostrongylus</i> spp.	***	***
IG10	<i>Angiostrongylus</i> spp.	98,57	73,33	IG26	Não identificado	**	**
IG11	<i>Angiostrongylus</i> spp.	87,14	48,10	IG27	<i>Angiostrongylus</i> spp.	95,71	74,29
IG12	Não identificado	82,38	62,86	IG28	<i>Angiostrongylus</i> spp.	91,43	48,57
IG13a*	<i>A.abstrusus</i>	74,76	48,57	IG29	<i>Angiostrongylus</i> spp.	95,24	66,67
IG13b*	Não identificado	33,83	12,03	IG30	<i>Angiostrongylus</i> spp.	90,48	30,00
IG14a*	<i>A.abstrusus</i>	57,14	26,53	IG31	<i>Angiostrongylus</i> spp.	91,90	43,33
IG14b*	Não identificado	57,14	42,86	IG32	<i>Angiostrongylus</i> spp.	82,38	33,33
IG15	<i>Angiostrongylus</i> spp.	88,57	40,00	IG33	<i>Angiostrongylus</i> spp.	63,33	28,57
IG16	<i>Angiostrongylus</i> spp.	73,81	35,71	IG34	<i>A.abstrusus</i>	**	**

Legenda:

*Isolados de morfologias diferentes em uma mesma amostra. **Material danificado; *** Isolado com larva do tipo L2.

De acordo com os resultados do teste Kruskal-Wallis, as comparações entre os isolados ambientais e os de referência foram significantes ($p < 0,001$). O gráfico da Figura 32 demonstra que os isolados ambientais sugestivos de *A. cantonensis* quando comparados com o isolado de referência da mesma espécie apresentaram níveis mais elevados de similaridade, sendo que 75% dos grupos ficaram entre 85% a 99%.

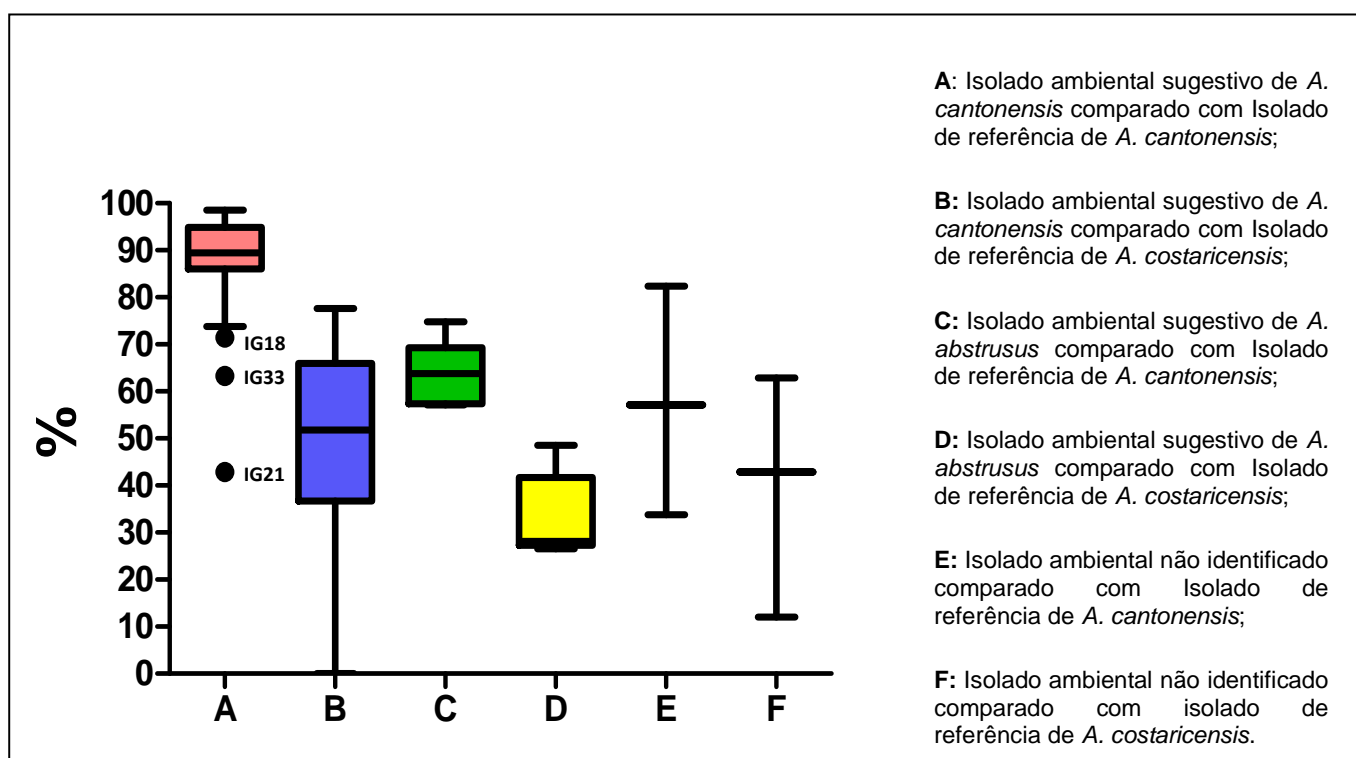


Figura 32- Análise de similaridade fenotípica por escore, segundo teste Kruskal-Wallis, de três grupos de isolados ambientais comparados com isolados de referência de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*.

5.5.6 Análises de amostras ambientais associadas a roedores

Das regiões estudadas, foi possível efetuar análises em roedores ou fezes destes em três bairros da cidade de São Paulo: Parque Fernanda, na região sul; Jaçanã na região norte; e Cidade Tiradentes, no extremo leste da cidade.

No Parque Fernanda foram capturados e encaminhados para o laboratório quatro *Rattus norvegicus* (Figura 33 A) em 2011, dos quais dois apresentaram vermes adultos de nematódeos, lesões com ovos e larvas nos pulmões e presença de larvas L1 nas fezes (Figura 33 B,C,D, E e F).

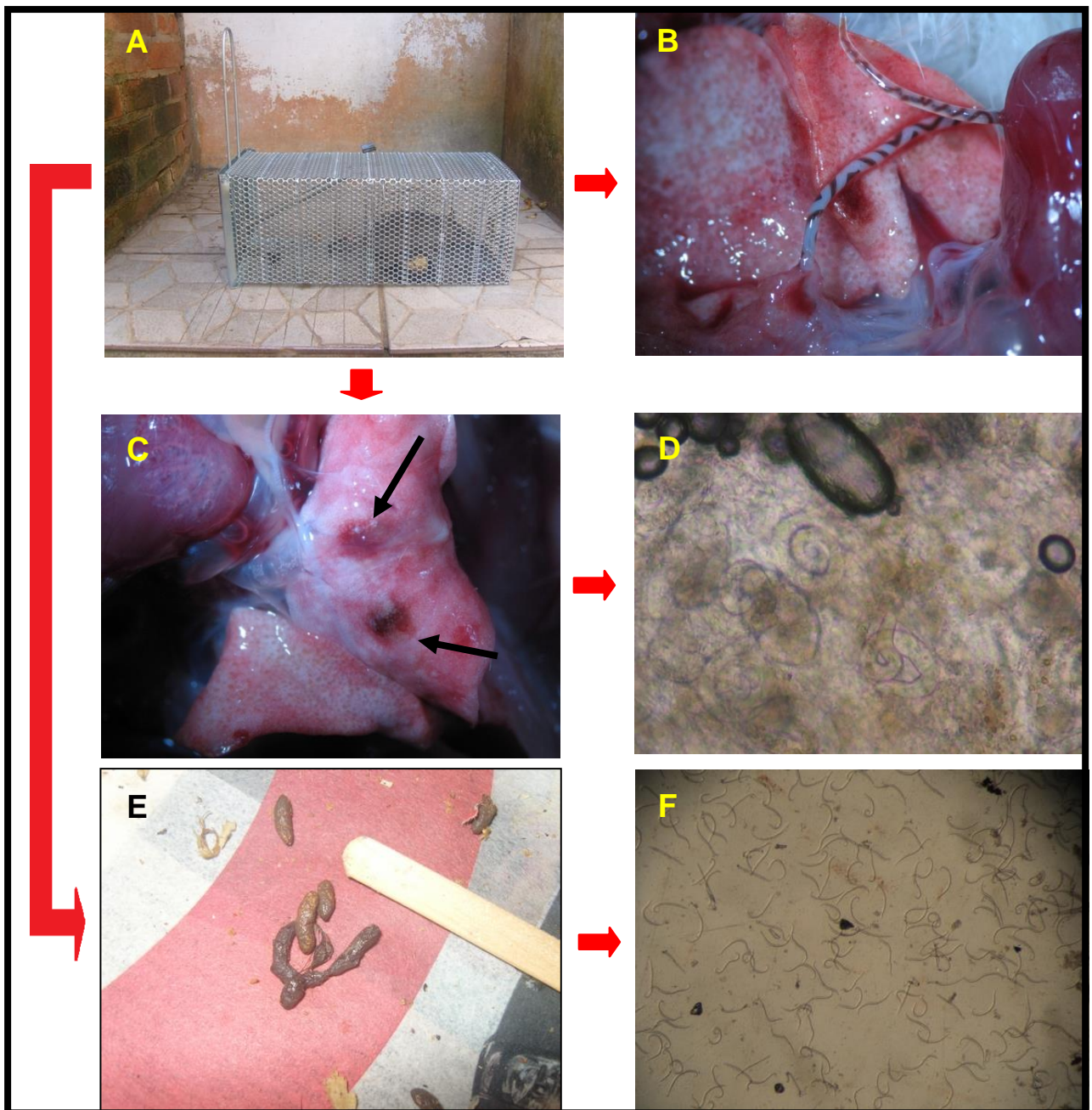


Figura 33- Eventos relacionados com isolamento de nematódeo na zona sul da cidade de São Paulo- **A** *Rattus norvegicus* capturado em área urbana do Parque Fernanda; **B**: Vermes adultos de nematódeos recuperados nas artérias pulmonares de roedor **C**: Presença de lesões em pulmão de roedor infectado por metastrongilídeo; **D**) Tecido pulmonar de *Rattus norvegicus* entre lâminas evidenciando larvas L1 eclodidas e ovos de nematódeo; **E**) Fezes de *Rattus norvegicus* coletadas para análise e **F**: Larvas L1 isoladas das fezes de roedor naturalmente infectado por nematódeo no Parque Fernanda- SP. **Fonte:** Mota DJG; Pinto PLS, 2011.

Uma fêmea de *Rattus norvegicus* apresentou infecção pulmonar por 14 vermes e um indivíduo macho estava parasitado por oito vermes.

As análises morfológicas revelaram que os nematódeos possuíam corpos filiformes e afilados nas extremidades anteriores (Figura 34), aberturas orais simples, esôfagos claviformes e poros excretores localizados lateralmente, abaixo da região posterior do esôfago, em ambos os sexos (Figura 35 A). Nas fêmeas, as vulvas se situavam nas extremidades posteriores dos corpos (Figura 35 B) e os machos, possuíam bolsas copuladoras bilobadas e pequenas, um par de espículos longos e finos e gubernáculos curvos (Figura 35 D). Os resultados das medidas dos parâmetros morfológicos de cinco espécimes estão representados na Tabela 10. Destes isolados, dois vermes foram encaminhados para análise por biologia molecular.

Concomitantemente, as larvas L1 extraídas das fezes do espécime macho de roedor, antes da eutanásia, foram utilizadas para infecção em *Biomphalaria glabrata* e, após 45 dias, as larvas L3 decorrentes foram inoculadas em modelo experimental (item 4.7- e 4.7.3) possibilitando o isolamento do ciclo de *A.cantonensis*.



Figura 34 – Vermes adultos isolados de pulmões e coração de *Rattus norvegicus* no Parque Fernand. **Fonte:** Pinto, PLS, 2011.

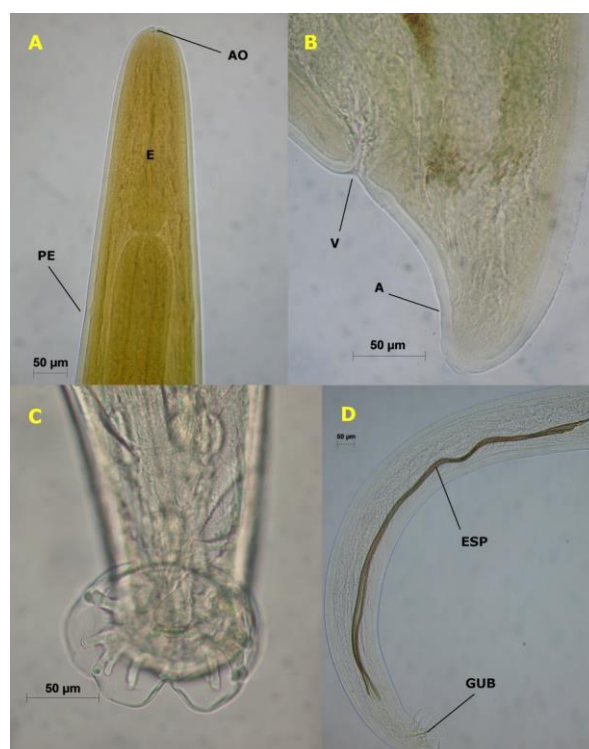


Figura 35 – Morfologia de vermes adultos de isolados de *Rattus norvegicus* de área urbana em São Paulo, Brasil. A: região anterior **AO**= abertura oral, **E**= esôfago, **PE**= poro excretor; B: região posterior fêmea: **V**= vulva, **A**= ânus; C: Bolsa copuladora; D: região posterior do macho: **ESP**= espículos; **GUB** = gubernáculo. **Fonte:** Melo LVC; Mota DJG, 2012.

Tabela 10. Valores médios (mm) de cinco vermes adultos isolados de *Rattus norvegicus* na zona sul de São Paulo.

Isolado	Sexo	n	CTC	L	CE	CBE	DPE	E>	E<	G	DVC	DAC
Natural	M	3	20,45	0,30	0,29	0,03	0,37	1,21	1,19	0,11	-	-
	F	2	28,44	0,46	0,31	0,03	0,43	-	-	-	0,23	0,06

Legenda: CTC – Comprimento Total do Corpo; L – Largura meio do corpo; CE – Comprimento do Esôfago; CBE – Comprimento da Base do Esôfago; DPE – Distância do Poro Excretor a região anterior; E> – Espículo maior; E< – Espículo menor; G – Gubernáculo; DVC – Distância da Vulva a Cauda; DAC – Distância do Ânus a Cauda.

Da região norte da cidade, foram encaminhadas duas amostras ambientais de fezes de *Rattus* spp. no bairro Jaçanã, em 2013. As análises deste local foram negativas para larvas de nematódeos. Já no bairro Cidade Tiradentes (zona leste), foram analisadas nove amostras também coletadas do solo, em 2015. Essas amostras corresponderam a duas de *Rattus* sp. e cinco de *Rattus rattus* negativas para nematódeos e duas de *Rattus norvegicus* apresentaram larvas L1 mortas e ressecadas (Figura 36), não sendo possível sua inoculação em modelo experimental, tendo sido encaminhadas apenas para análise de biologia molecular.



Figura 36 – Morfologia de larva L1 ressecada encontrada nas fezes de *Rattus norvegicus* coletada em área urbana do bairro Cidade Tiradentes em novembro de 2015. **Fonte:** Melo LVC, 2015.

5.5.7 Análise das infecções experimentais em roedores

Dos 36 grupos de moluscos analisados, foram feitos isolamento em modelos experimentais a partir de 10 (27,78%), destes foram recuperados vermes jovens e/ou adultos em todos os grupos em que foram realizados os inóculos. A Tabela 11 demonstra a relação de tempo de infecção dos roedores após inoculação das larvas, tempo de duração das infecções, quantidade de vermes recuperados por grupo e padrão do comportamento biológico do parasito, caracterizado pelo tropismo para o cérebro e pulmões, compatível com a espécie *Angiostrongylus cantonensis*.

Tabela 11. Infecções experimentais de roedores a partir de larvas de moluscos naturalmente infectados para caracterização de padrão de infecção biológica

Grupo	Hospedeiro intermediário	Hospedeiro experimental (n)	Nº de larvas por animal inoculadas	Tempo de infecção em dias	Vermes recuperados	Órgão	Padrão biológico
IG4	<i>P. variegatus</i>	Wistar (2)	15	60	15	coração/pulmão	<i>A. cantonensis</i>
IG5	<i>S. linguaeformis</i>	Wistar (2)	15	77	13	pulmão	<i>A. cantonensis</i>
IG6	<i>S. linguaeformis</i>	Hamster (1)	13	20	5	cérebro	<i>A. cantonensis</i>
IG8	<i>A. fulica</i>	Hamster (2)	20	20	6	cérebro	<i>A. cantonensis</i>
IG9*	<i>B. willibaldoi</i>	Hamster (2)	15	21	15	cérebro	<i>A. cantonensis</i>
IG9*	<i>B. willibaldoi</i>	Hamster (2)	15	30	12	cérebro/pulmão	<i>A. cantonensis</i>
IG11	<i>A. fulica</i>	Hamster (2)	15	17	15	cérebro	<i>A. cantonensis</i>
IG28	<i>R. decollata</i>	Hamster(2)	20	27	6	cérebro	<i>A. cantonensis</i>
IG30	<i>D. laeve</i>	Hamster (2)	5	39	3	pulmão	<i>A. cantonensis</i>
IG31	<i>L. goodalli</i>	Hamster (2)	5	39	2	pulmão	<i>A. cantonensis</i>
IG32	<i>D. laeve</i>	Wistar (2)	30	45	17	pulmão	<i>A. cantonensis</i>
Média			15,27	35,90	9,90		

* Mesmo grupo com tempos de infecção diferentes, devido à letalidade.

As infecções experimentais em hamsters foram provenientes dos grupos IG6, IG8, IG9, IG11, IG28, IG30 e IG31, correspondendo a 70% das análises.

O número de larvas utilizado variou de 5 a 20 L3 e o tempo de infecção máximo alcançado foi de 39 dias.

Em infecções de 17 a 27 dias, foram recuperados vermes jovens nos cérebros (figura 37B). Porém, no grupo IG9 dois animais sobreviveram até o 30º dia, dos quais foram recuperados tanto vermes jovens nos cérebros, quanto adultos nos pulmões. Já as infecções que alcançaram o 39º dia, apresentaram apenas vermes adultos nos pulmões (Figura 37C).

Foi possível observar que as reações à infecção prejudicaram as funções orgânicas dos animais, apresentando comprometimento neurológico, com paralisia das patas traseiras, alterações das funções oculares e inapetência (Figura 37 A), tendo sido eutanasiados em diferentes períodos, de acordo com a evolução da doença.

As amostras de fezes dos hamsters não apresentaram larvas L1, porém foram observados ovos não embrionados em tecido pulmonar de infecções que atingiram o 39º dia (Figura 37F).

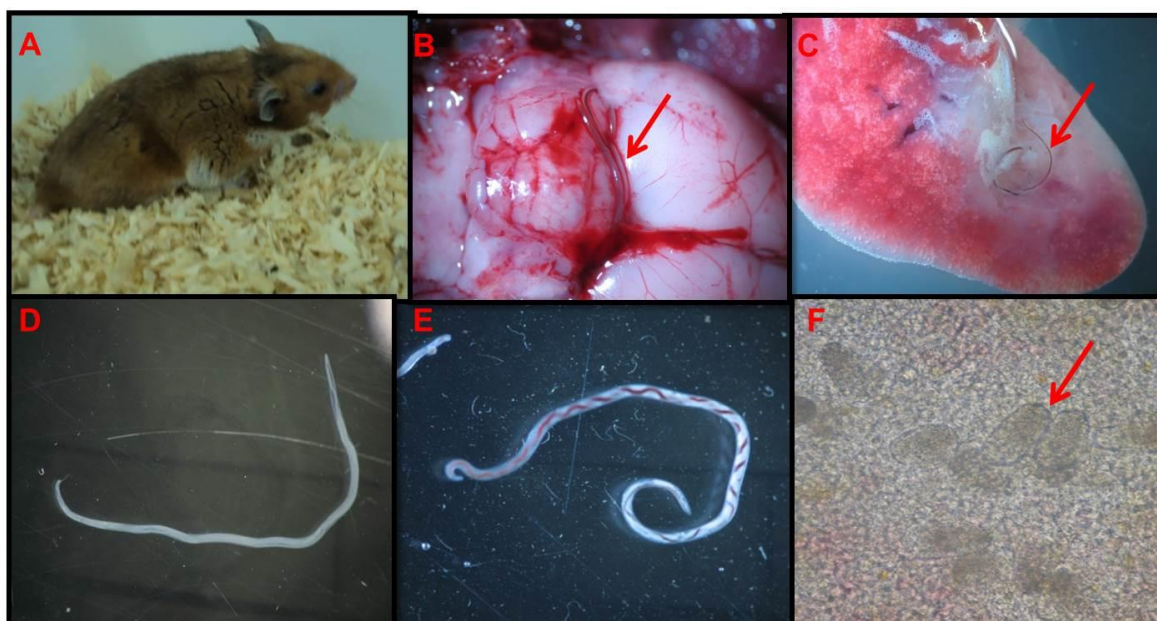


Figura 37: (A) Hamster com 21 dias de infecção; (B) Verme jovem no cérebro de hamster com 21 dias de infecção com focos hemorrágicos (C); Presença de verme no pulmão de hamsters com 30 dias de infecção; (D); Verme macho isolado de pulmão de hamsters com 30 dias de infecção; (E) Verme fêmea isolada de pulmão de hamsters com 30 dias de infecção; (F); ovos não embrionados no pulmão de hamsters com 39 dias de infecção. **Fonte:** Mota DJG; Pinto PLS, 2011.

Em relação aos ratos Wistar, as infecções experimentais decorreram dos grupos IG4, IG5 e IG32 que representou (30% das análises). Sendo que o

número de larvas utilizado variou de 15 a 30 L3 e o tempo de infecção foi de 45 a 77 dias, com os vermes recuperados no coração e pulmões (Figura 38 A e E).

As reações à infecção se restringiram a presença de lesões pulmonares (Figura 38 A), sem o comprometimento do comportamento dos roedores. Já as amostras de fezes apresentaram larvas L1 a partir do 42º dia e ovos embrionados, assim como larvas L1 eclodidas, foram observados em tecido pulmonar em todos os animais, após necropsia.

Todos os vermes extraídos de ratos estavam em fase adulta (Figura 39 A e E), porém as análises morfométricas só foram possíveis em isolados provenientes dos grupos IG4 e IG 32 e estão expressas na Tabela 12.

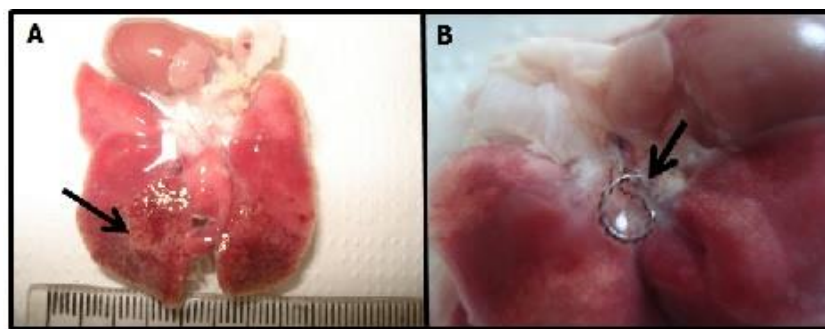


Figura 38: (A)- Lesões pulmonares causadas pela presença de larvas e ovos de nematódeo no pulmão de roedor. (B)- Presença de verme adulto na artéria pulmonar. **Fonte:** Mota DJG, 2012.

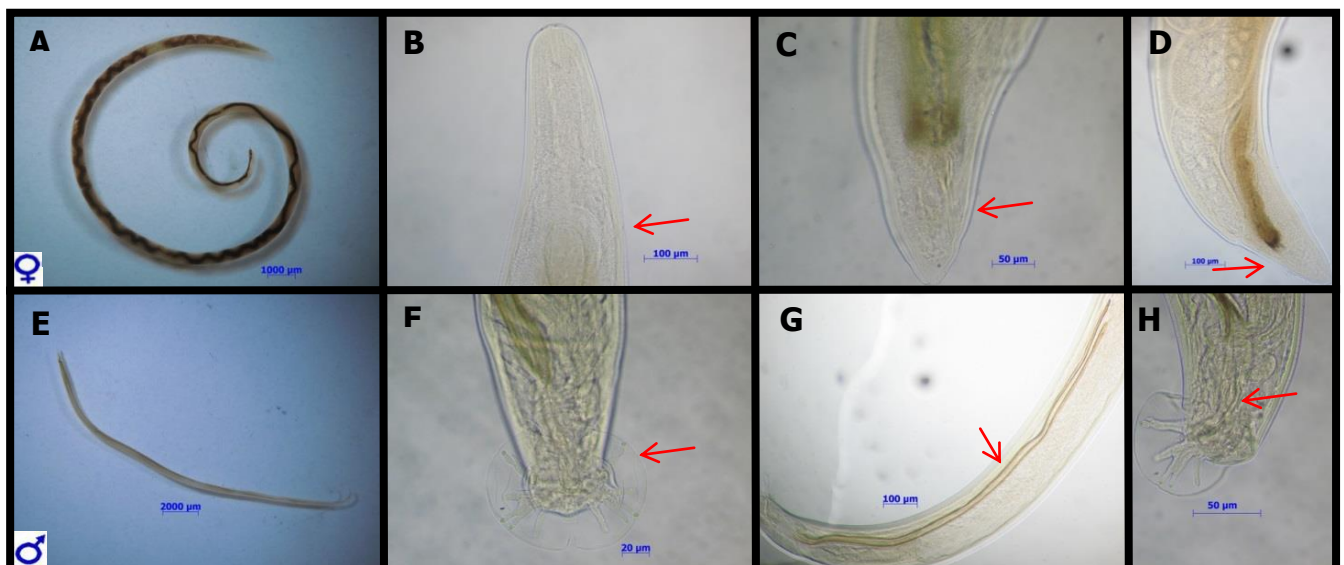


Figura 39: vermes adultos: fêmea (A); esôfago e poro excretor (B); ânus da fêmea (C); vulva (D); macho (E); bolsa copuladora (F); espículos (G); gubernáculo (H). **Fonte:** Mota DJG; Melo LCV, 2012.

Além das infecções experimentais a partir de L3 extraídas de amostras de moluscos ambientais, foi feita a infecção de *B. glabrata* e o repique feito em ratos Wistar no laboratório, gerou a extração de 19 vermes adultos, cujas medidas estão expressas na tabela 12.

Tabela 12. Médias morfométricas (mm) de vermes adultos recuperados de infecção experimental em ratos Wistar a partir de lesmas e *B.glabrata*.

Grupo	Gênero (n)	Média ± desvio padrão							
		CTC	L	CE	DPE	DVC	DAC	CEsp	CGub
IG4	Macho (3)	22,75 ± 0,68	0,33 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,42 ± 0,01	-	-	1,27 ± 0,07	0,11 ± 0,01
	Fêmea (6)	32,16 ± 2,26	0,49 ± 0,04	0,36 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,06 ± 0,01	-	-
IG32	Macho (10)	20,48 ± 1,96	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,47 ± 0,02	-	-	1,33 ± 0,06	0,12 ± 0,01
	Fêmea (7)	35,07 ± 1,03	0,54 ± 0,03	0,38 ± 0,04	0,48 ± 0,05	0,25 ± 0,03	0,07 ± 0,01	-	-
Pq. Fernanda	Macho (7)	20,01 ± 1,13	0,30 ± 0,04	0,31 ± 0,18	0,41 ± 0,04	-	-	1,27 ± 0,03	0,12 ± 0,04
	Fêmea (12)	25,36 ± 1,28	0,44 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,06 ± 0,01	-	-

Legenda: CTC – comprimento total do corpo; L – largura meio do corpo; CE – comprimento do esôfago; BE – comprimento da base do esôfago; DPE – distância do poro excretor a região anterior; DVC – distância da vulva a cauda; DAC – distância do ânus a cauda; CEsp – comprimento do espículo; CGub – Comprimento do gubernáculo.

Dos dez grupos que foram isolados vermes adultos e/ou jovens, apenas foi encaminhado para análise molecular um verme adulto recuperado em modelo experimental infectado a partir do grupo IG9, devido a dificuldades operacionais, tendo sido armazenados em freezer -20°C para estudos posteriores.

5.5.8 Análise por biologia molecular

Em relação às amostras ambientais de moluscos, as análises moleculares foram efetuadas em 29 dos 36 grupos, correspondendo a 80,56%, onde foram comparados os perfis de bandas das amostras obtidas de hospedeiros naturais e experimentais com os isolados de referência de *A. costaricensis* e *A. cantonensis*. De acordo com os resultados expressos na Figura 40, foram identificadas as bandas de 650pb a 700pb, compatíveis com o isolado de *A. cantonensis* utilizado como controle positivo em 20 isolados extraídos de moluscos.

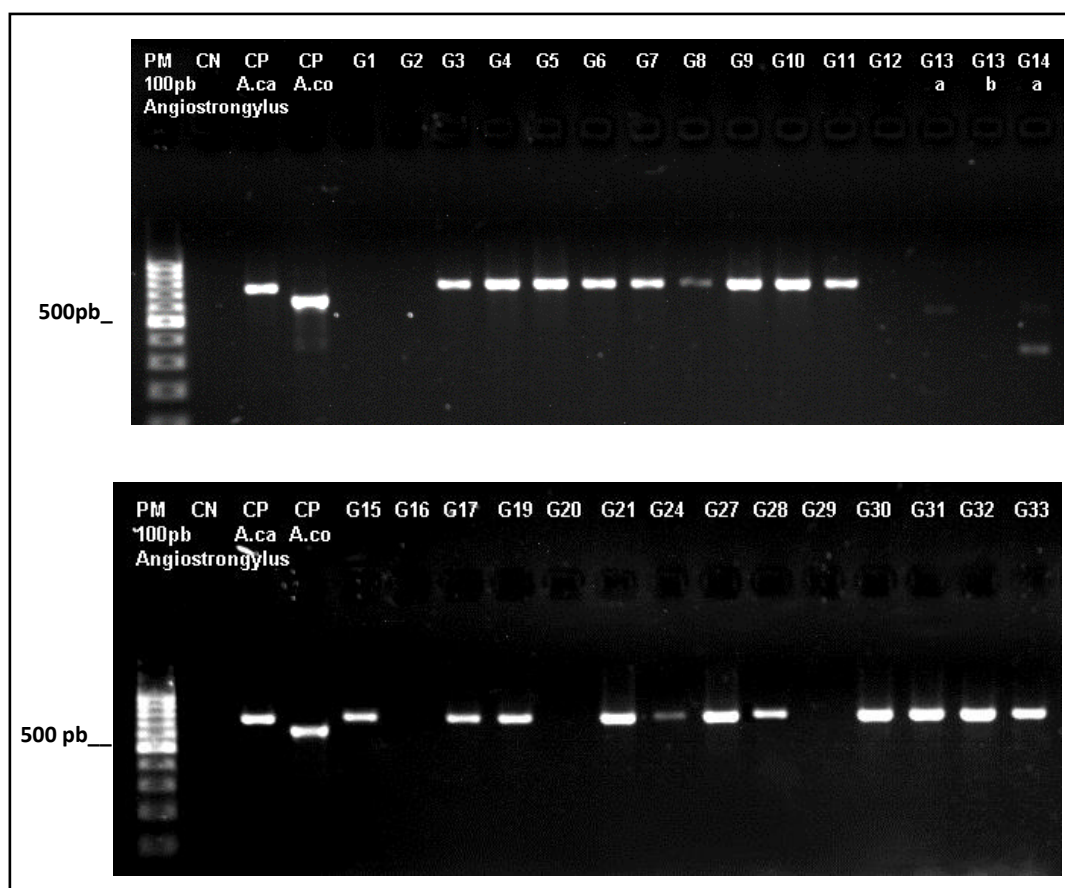


Figura 40 – Gel PCR Convencional comparando DNAs dos isolados referência **A.ca** (*A.cantonensis*) de **A.co** *A. costaricensis* com DNAs de 29 isolados ambientais de moluscos terrestres : **G1**, *A.fulica*- Bauru; **G2**, *A.fulica*- Mongaguá; **G3**, *B. willibaldoi*- Parque Fernanda- SP; **G4**, *P.variegatus*- Itaquaquetuba; **G5**, *S.linguaeformis*- Jaçanã ; **G6** *S.linguaeformis*- Parque Fernanda; **G7**- *S.linguaeformis*- Parque Fernanda; **G8**, *A.fulica*, Campo grande –SP; **G9**, *B. willibaldoi*, Parque Fernanda-SP; **G10**, *L.flavus* – Parque Fernanda- SP; **G11** – *A.fulica* –Freguesia do Ó; **G12** *S.linguaeformis*- Parque Fernanda; **G13a**, *A.fulica*- Bauru; ; **G13b**, *A.fulica*- Bauru ; **G14a**, *A.fulica*- Bauru; **G15**, *S.linguaeformis*- Parque Fernanda; **G16**, , *S.linguaeformis*- Parque Fernanda ; **G17**, *S.linguaeformis*- Parque Fernanda; **G19**, *A.fulica* –Freguesia do Ó; **G20**, *R.decollata*- Jardim Amália-SP; **G21** *D.laeve*- Parque Fernanda; **G24**- *L.concentrica*- Jaçanã; **G27**, *R.decollata*- Jardim Amália; **G28**, *R.decollata*- Jardim Amália **G29**, *B.similaris*, Parque Fernanda- **G30**, *D.laeve*– Cidade Tiradentes- SP; **G31** – *L.goodalli*- Cidade Tiradentes; **G32** *D.laeve*- Cidade Tiradentes; **G33**, *P.besckei*- Cidade Tiradentes . **Fonte:** Gava, R (2015). **Legenda:** **PM**:Peso Molecular; **pb**- pares de base; **CN**: controle negativo; **CP A.ca**: Controle positivo de *A.cantonensis* e **CP A.co**: Controle positivo de *A.costaricensis*.

Foram feitas também análises moleculares em um verme jovem extraído do cérebro de modelo experimental (hamster) relativo ao grupo IG9, L1 de fezes e dois vermes adultos recuperados de pulmões de *R. norvegicus* naturalmente infectados coletados no bairro Parque Fernanda (Figura 41B e C); um verme adulto extraído de modelo experimental (Wistar) relativo ao grupo IG4 (Figura 42); e larvas L1 ressecadas isoladas de fezes de *R. norvegicus* coletadas em peridomicílio de residência-caso na Cidade Tiradentes (Figura 43).

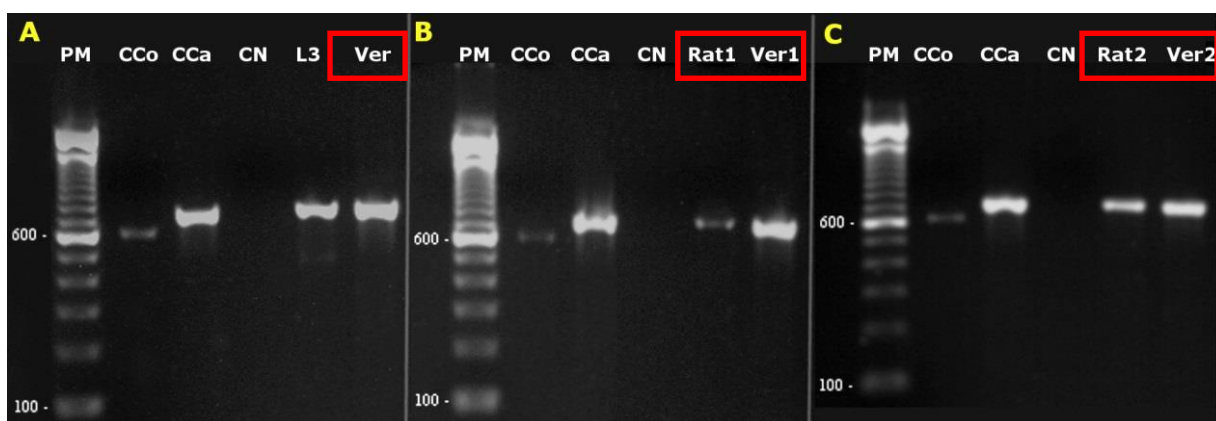


Figura 41 – Gel PCR convencional comparando DNAs de isolados de *A. costaricensis*-IAL (CCo) e *A. cantonensis* (CCa) cedido pelo CDC Atlanta com isolado em cérebro de hamster de infecção experimental e de dois isolados naturais de larvas L1 nas fezes e de vermes adultos no pulmão de *R. norvegicus* no bairro Parque Fernanda-SP: **A** isolado de verme jovem extraído do cérebro (**Ver**) de hamsters a partir do inóculo de larvas L3 isoladas de *Belocaulus willibaldoi*; **em B** de larvas L1 isoladas das fezes de rato (**Rat 1**) e de verme adulto do pulmão (**Ver 1**) de rato e **em C** de larvas L1 isoladas das fezes (**Rat 2**) e de verme adulto do pulmão (**Ver 2**) de rato. **Fonte:** Gava R, 2011.

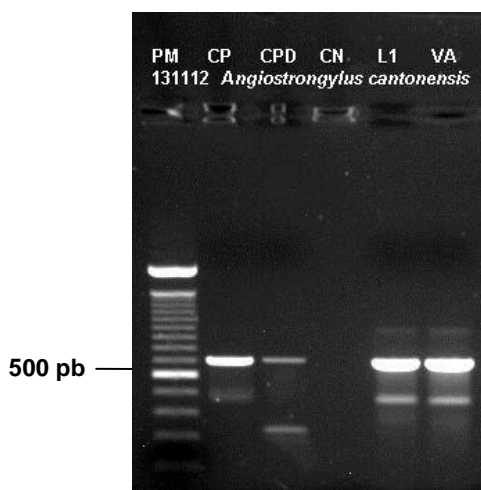


Figura 42: Análise molecular a partir da extração de DNA de larvas L1 de fezes e de verme isolado em pulmão de rato comparadas com controle positivo de *A. cantonensis*. **Legenda:** PM-Peso Molecular; CP-Cepa padrão de *A. cantonensis* CPD-Cepa padrão diluída de *A. cantonensis* CN- Controle negativo (água) L1 - Larvas L1 isoladas de Wistar, VA -Vermes adultos isolados de Wistar. **Fonte:** Gava R, 2012.

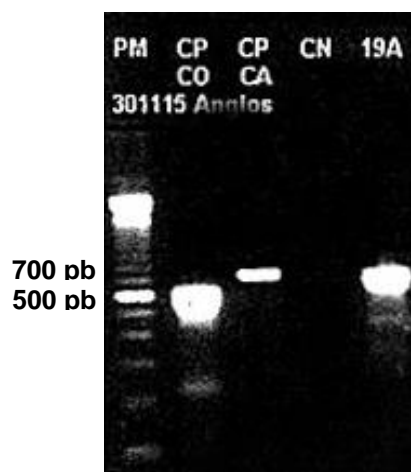


Figura 43: Resultados da biologia molecular por PCR *in house* em L1 extraídas de fezes de *R. norvegicus*, coletadas no entorno da residência caso na Cidade Tiradentes. **PM:** peso molecular **CPCO:** controle positivo *A. costaricensis* ; **CPCA** controle positivo *A. cantonensis*, **CN,** controle negativo e **19A-** DNA extraído de larvas L1 de fezes de rato da Cidade Tiradentes. **Fonte:** Meira-Strejevitch CS, 2015.

5.5.9 Distribuição ambiental de moluscos positivos para *Angiostrongylus cantonensis* e *Aelurostrongylus abstrusus*

Em dois dos 15 municípios que compõem a mesorregião metropolitana de São Paulo (São Paulo e Itaquaquetuba) foram encontrados moluscos infectados com *Angiostrongylus cantonensis* e *Aelurostrongylus abstrusus* esteve relacionado a um município do interior e outro no litoral sul do estado de São Paulo (Bauru e Mongaguá), conforme Figura 44.

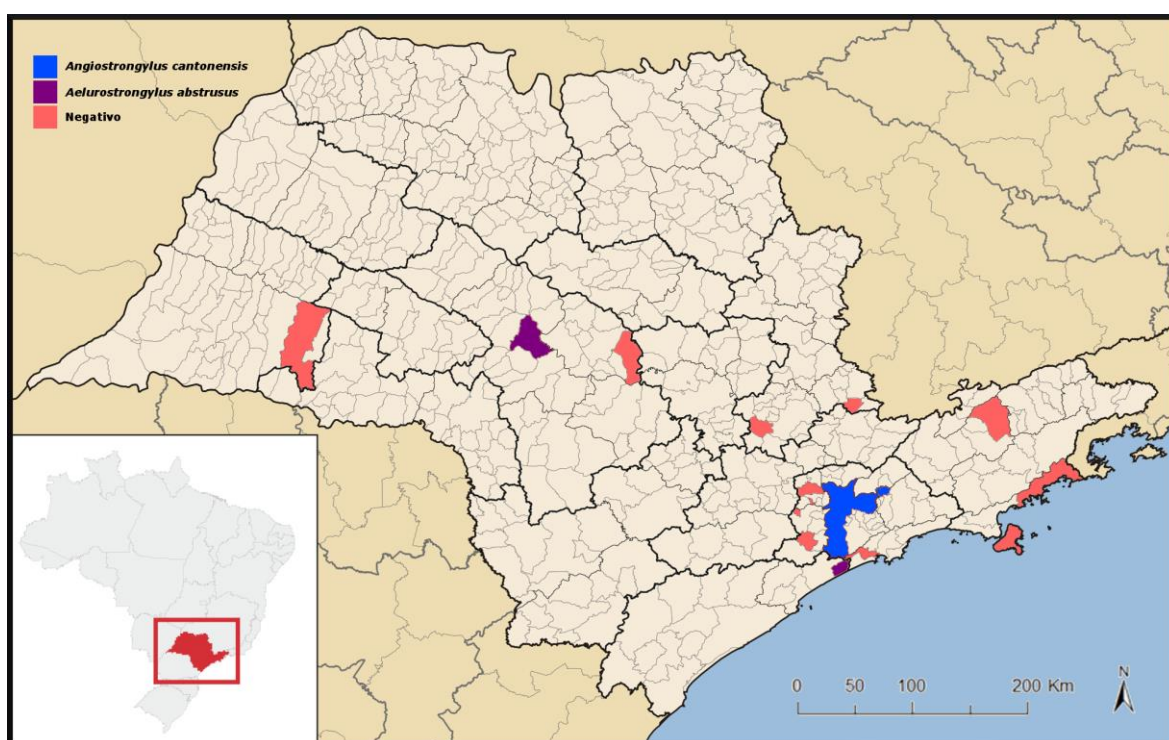


Figura 44. Distribuição dos municípios com moluscos naturalmente infectados por *A.cantonensis* e *A.abstrusus* no estado de São Paulo. **Fonte:** <http://www.saopaulo.sp.gov.br/> (Adaptado) 2018.

5.5.10 Análise da infecção por larvas de metastrongilídeos em moluscos por demanda espontânea e busca ativa

Das 65 amostras (44,52%) recebidas por demanda espontânea, 11 foram positivas para metastrongilídeos, sendo oito grupos infectados por *A. cantonensis* e três por *A. abstrusus*.

Na cidade de São Paulo, foram identificadas amostras positivas para *A. cantonensis* em quatro bairros: Parque Fernanda, Jardim Amália, Freguesia do

Ó e Campo Grande, envolvendo três hospedeiros intermediários: *A. fulica*, *Rumina decollata* e *Sarasinula linguaeformis*. Já no município de Bauru foram encontrados espécimes de *A. fulica* infectadas por *A. abstrusus* em dois bairros: Parque das Nações e Bom Samaritano, nos quais não foram efetuadas as coletas por busca ativa devido à distância geográfica. Assim como no município de Itaquaquecetuba, que apresentou a presença de *A. cantonensis* em uma lesma da espécie *P. variegatus* (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição das amostras de moluscos naturalmente infectadas por *A. cantonensis* e *A. abstrusus* por demanda espontânea e busca ativa conforme município de origem.

Cidade	Bairro	Tipo de amostra *	Espécie hospedeira	Qtde grupos	Espécie parasita
São Paulo	Parque Fernanda	DE	<i>Sarasinula linguaeformis</i>	1	<i>A. cantonensis</i>
	Parque Fernanda	BA	<i>Sarasinula linguaeformis</i>	5	
	Parque Fernanda	BA	<i>Belocaulus willibaldoi</i>	2	
	Parque Fernanda	BA	<i>Deroceras laeve</i>	1	
	Parque Fernanda	BA	<i>Rumina decollata</i>	1	
	Parque Fernanda	BA	<i>Bradybaena similaris</i>	1	
	Parque Fernanda	BA	<i>Limacus flavus</i>	1	
	Cidade Tiradentes	BA	<i>Deroceras laeve</i>	2	
	Cidade Tiradentes	BA	<i>Prohappia besckei</i>	1	
	Cidade Tiradentes	BA	<i>Lamellaxis goodalli</i>	1	
	Jardim Amália	DE	<i>Belocaulus willibaldoi</i>	1	
	Jardim Amália	DE	<i>Rumina decollata</i>	2	
	Freguesia do Ó	DE	<i>Achatina fulica</i>	2	
	Jaçanã	BA	<i>Sarasinula linguaeformis</i>	1	
	Jaçanã	BA	<i>Leptinaria concentrica</i>	1	
Campo Grande	DE	<i>Achatina fulica</i>	1		
Bauru	Parque das Nações	DE	<i>Achatina fulica</i>	2	<i>A. abstrusus</i>
	Bom Samaritano	DE	<i>Achatina fulica</i>	1	
Mongaguá	Não informado	BA	<i>Achatina fulica</i>	1	<i>A. abstrusus</i>
	Não informado	BA	<i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	1	
Itaquaquecetuba	Jardim Paineira	DE	<i>Phyllocaulis variegatus</i>	1	<i>A. cantonensis</i>
Total	-	-	12 espécies	30	2 espécies

*Legenda: BA- busca ativa; DE- demanda espontânea.

5.5.11 Análise das coletas por busca ativa para vigilância ambiental

As 73 coletas de moluscos desencadeadas para estudo de biocenose urbana, ocorreram a partir de demanda espontânea do Parque Fernanda (região sul da cidade de São Paulo), onde primeiramente foram encontradas lesmas da espécie *Sarasinula linguaeformis* naturalmente infectadas por *A. cantonensis*. Sendo que para a mesma região houve também o relato da presença de acúmulo de entulhos, tocas e fezes de roedores e da ocorrência de conchas roídas de moluscos no ambiente próximas as tocas de roedores (Figura 45 A, B, C e D).



Figura 45. (A) Presença de entulho em área urbana do Parque Fernanda- São Paulo favorecendo presença de roedores (B); Presença de toca de roedor e fezes próximo a horta em condomínio do bairro Parque Fernanda (C) Encontro de crânio de roedor e conchas roídas de *Bradybaena similis* e *Rumina decollata*; (D) Horta comunitária do condomínio. **Fonte:** Mota DJG 2011 .

A área onde foram realizadas as coletas correspondeu a um condomínio e seu entorno, situado em área residencial de 1000 m² (Figura 46), durante o período de janeiro de 2009 a janeiro de 2011. O local apresentou condições favoráveis para estabelecimento de biocenose de roedores e moluscos convivendo no mesmo ambiente.



Figura 46 – A seta indica a área de coletas de moluscos naturalmente infectados por *Angiostrongylus cantonensis* no bairro Parque Fernanda, São Paulo, Brasil, no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2011.
Fonte: Google Earth, 2018: Disponível em: <http://www.google-earth.com.br>.

Na região do condomínio há um nascente próximo a uma horta comunitária, onde há cultivo de bananeiras, hortaliças e árvores frutíferas que propiciam ao local ambiente sombreado, úmido que favorece a proliferação de moluscos terrestres. No entorno do condomínio pode-se observar também um terreno com deposição de lixos domésticos e restos de construção, onde se encontrava com facilidade moluscos e vestígios de roedores (fezes e tocas).

No período estudado, foram analisados 2752 moluscos divididos em 73 amostras. Na Tabela 14 é possível verificar que foram encontradas oito espécies de moluscos no local, sendo seis espécies de lesmas e duas de caracóis. Das amostras analisadas 14 foram positivas para larvas de nematódeos, representando índice de 19,17% de positividade. As espécies de lesmas *S.linguaeformis* e *B.willibaldoi* foram às espécies em que se encontraram os maiores índices de positividade (33,33%) seguidas por *L.flavus* (20%), *D.laeve* (16,66%), *R.decollata* (12,50%) e *B.similaris* (6,25%), totalizando seis espécies naturalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*.

Tabela 14. Número de moluscos coletados por busca ativa para vigilância ambiental realizada no Parque Fernanda no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2011 com valores de amostras positivas para *Angiostrongylus cantonensis*.

Espécies	Número de Espécimes analisados	Número amostras analisadas	Amostras positivas	% positivos
<i>B. similaris</i>	957	16	1	6,25
<i>S. linguaeformis</i>	575	15	5	33,33
<i>R. decollata</i>	713	8	1	12,50
<i>D. laeve</i>	271	15	2	16,66
<i>B. willibaldoi</i>	200	12	4	33,33
<i>P. boraceiensis</i>	22	2	0	0,00
<i>L. flavus</i>	13	5	1	20,00
<i>P. variegatus</i>	1	1	0	0,00
Total	2752	73	14	19,17

Nesta mesma área foi possível se constatar a infecção natural de dois *Rattus norvegicus* em 2011 por *A.cantonensis* conforme foi relatado no item 5.5.7, sendo possível o isolamento do nematódeo em laboratório a partir da infecção em *B.glabrata* por larvas L1 do parasita e depois por meio de repiques sucessivos em ratos Wistar.

5.5.12 Análise das coletas por busca ativa para estudos de casos humanos suspeitos/ diagnosticados como meningite eosinofílica.

Mongaguá – Litoral sul de São Paulo

Em outubro de 2010 quatro moradores de uma mesma família de Mongaguá deram entrada no Hospital do Servidor Público Estadual com sintomas clássicos de meningite eosinofílica; a pesquisa de anticorpos anti- *A. cantonensis* por ELISA com antígenos heterólogos foi positiva nos quatro pacientes. O único evento comum a todos foi um encontro do qual participaram em um sítio no litoral de SP com ingestão de churrasco e banho de cachoeira. A Secretaria municipal de Saúde de Mongaguá coletou em novembro de 2010 no

peridomicílio da residência caso 23 moluscos, sendo 20 *A. fulica*, dois de *B. tenuissimus* e uma lesma *P. boraceinsis* e encaminhou para análise no Instituto Adolfo Lutz. Dos moluscos analisados, duas espécies *A. fulica* e *P. boraceinsis* apresentaram infecção pelo nematódeo *A. abstrusus* que compuseram grupos G2 e G34 deste estudo.

Distrito de Guarapiranga- Zona sul da Cidade de São Paulo

Em setembro de 2010, paciente do sexo masculino, 11 anos, residente na zona sul de São Paulo, foi admitido no serviço de emergência pediátrica com história de cefaleia persistente há três dias, sem febre ou outras queixas. Relato de presença de moluscos e roedores no peridomicílio. Exames laboratoriais indicaram 36% de eosinofilia no LCR. Equipe do Núcleo de Enteroparasitas foi até o domicílio da criança na região do bairro da Guarapiranga-São Paulo onde foram encontradas duas lesmas *B. willibaldoi* e uma *D. laeve* sendo negativas aos testes parasitológicos (Figura 47).

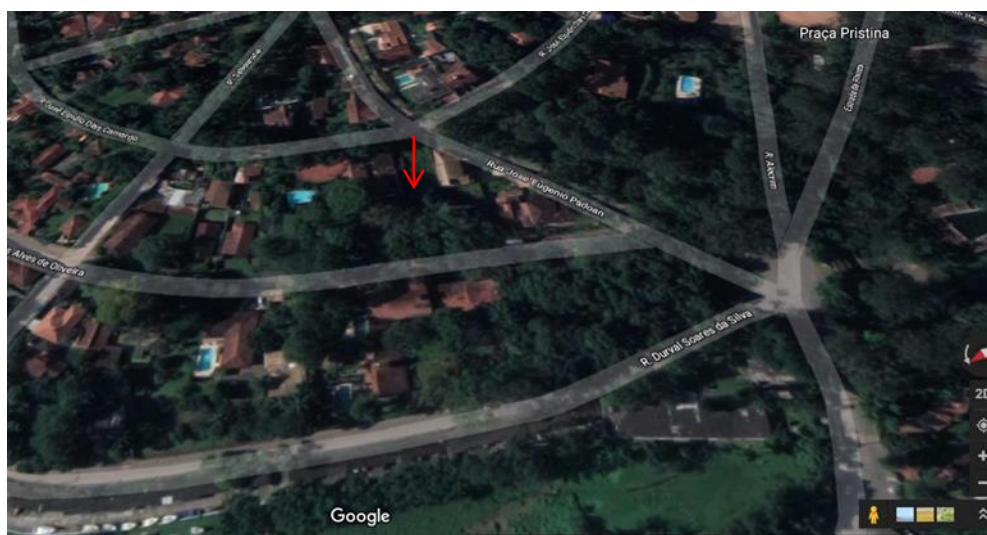


Figura 47- Vista geral de área de busca ativa por moluscos no domicílio de criança com quadro de meningite eosinofílica na região do bairro da Guarapiranga. **Fonte:** Google Earth, 2018: Disponível em: <http://www.google.earth.com.br>.

Dois Córregos - Interior de São Paulo

Em janeiro de 2012 foi encaminhado ao Núcleo de Enteroparasitas três exemplares de *A. fulica* de caso suspeito de meningite eosinofílica em menina de quatro anos residente em Dois Córregos, interior de São Paulo. Foi informado pela Secretaria Municipal de Saúde de Dois Córregos que os moluscos foram coletados em terreno a 20 metros da residência da criança. As análises parasitológicas nos caracóis não apresentaram infecção por nenhum nematódeo de interesse médico.

Distrito de Jaçanã- Zona norte de São Paulo

Em março de 2013 o Laboratório de Fauna do Centro de Controle de Zoonoses (LABFAUNA/CCZ) / Secretaria Municipal da Saúde da Cidade de São Paulo recebeu notificação de um caso suspeito de meningite eosinofílica em uma criança de um ano de idade, residente no distrito do Jaçanã, região norte da cidade de São Paulo. Foi realizada uma coleta por busca ativa de moluscos na rua em que residia a criança (Figura 48).



Figura 48 – Vista geral de área de busca ativa por moluscos no domicílio de criança suspeita de quadro de meningite eosinofílica no bairro do Jaçanã, São Paulo. **Fonte:** Google Earth, 2018: Disponível em: <http://www.google.earth.com.br>.

Foi possível a captura de um exemplar de *Sarasinula linguaeformis* e um exemplar de *Leptinaria concentrica*. A investigação parasitológica nos moluscos resultou no encontro de 401 larvas L3 infectando os moluscos que

foram identificadas por análise morfológica e molecular como sendo de *A.cantonensis* (grupos IG5 e IG24) deste estudo. A infecção experimental em ratos Wistar com larvas L3 extraídas de *S. linguaeformis* possibilitou a recuperação de 13 vermes adultos de *A.cantonensis* nos pulmões de dois roedores após 77 dias de infecção. Tais achados foram importantes para elucidar o caso, pois testes sorológicos realizados no IAL foram positivos indicando este como um caso confirmado de meningite eosinofílica causada por *A.cantonensis*.

Distrito de Cidade Tiradentes- Zona leste de São Paulo

Em outubro de 2015, uma criança de um ano e meio, residente na região leste da cidade de São Paulo (Figura 49), foi atendida no Hospital Municipal da Cidade Tiradentes com quadro agudo de meningite eosinofílica não esclarecida, levantando-se a suspeita de angiostrongilíase, corroborada pela presença de verme na região ocular e pelo relato de infestação de moluscos na residência caso. Amostras de liquor e soro foram submetidas às técnicas de *Dot-Elisa*, *Western blot* e PCR no Instituto Adolfo Lutz e, a partir da positividade das duas primeiras, a Supervisão de Vigilância em Saúde–Cidade Tiradentes (SUVIS-CT) foi notificada.

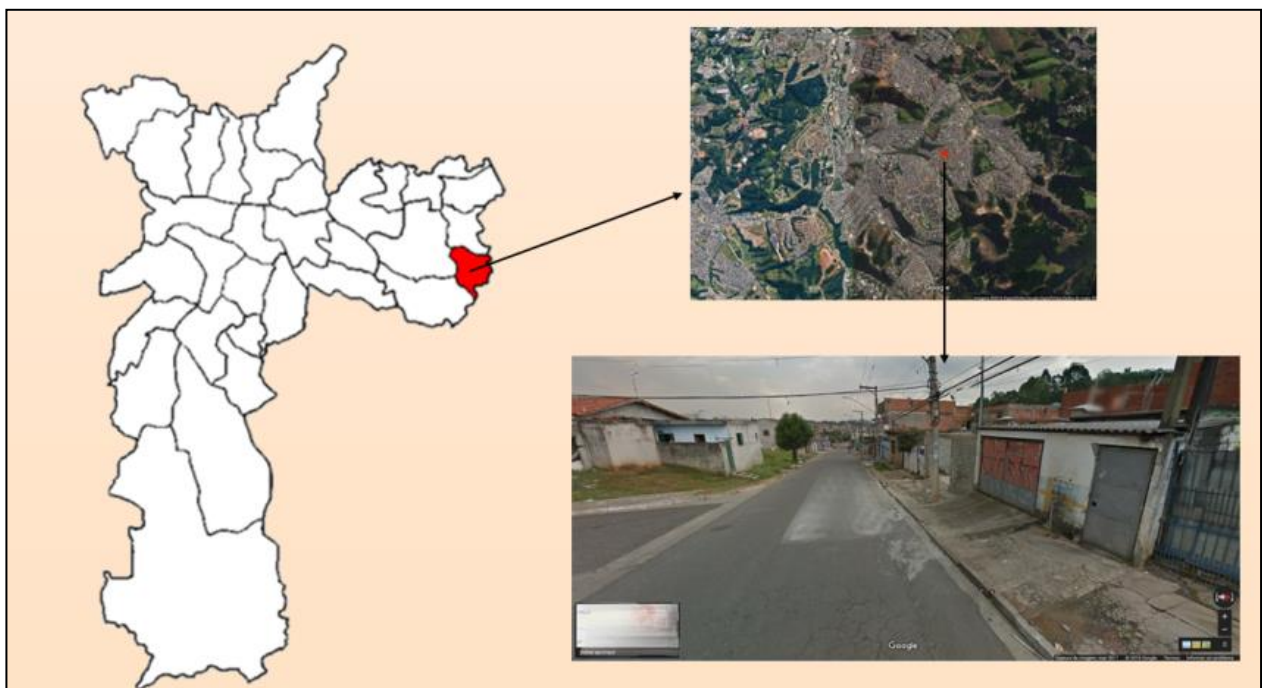


Figura 49: Localização geográfica e característica da região onde foi confirmado um caso autóctone de angiostrongilíase meningoencefálica na zona leste da cidade de São Paulo. **Fonte:** Googlemap®, 2018.

Dessa maneira a SUVIS-CT realizou duas buscas ativas no domicílio da criança para capturar moluscos que foram encaminhadas para o Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz pelo Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo. Em 28 de outubro de 2015 foram encaminhados dez moluscos terrestres para análise: sete *Deroceras laeve*, dois espécimes de *Lamellaxis goodalli* e uma *Prohappia besckei*. E em 06 de novembro de 2011 06/11/15 foram encaminhados 96 moluscos: 87 *Prohappia besckei*, sete *Lamellaxis goodalli* e duas *Deroceras laeve*. Posteriormente coletas ambientais de fezes de roedores foram encaminhadas também para análises parasitológicas.

Nos testes parasitológicos em *pool* da primeira amostra de lesmas *D. laeve* foram obtidas 570 larvas. Na segunda amostra foram obtidas 1791 larvas. Em *L. goodalli* na primeira amostra foram obtidas 88 larvas e posteriormente cinco larvas. O teste em *P. besckei* foi negativo na primeira amostra e na segunda amostra se recuperaram 160 larvas.

As análises morfológicas das larvas encontradas infectando os moluscos foram identificadas como sendo de *A.cantonensis* e compuseram os grupos (IG30, IG31, IG32 e IG3) deste estudo. Larvas L1 mortas e ressecadas foram encontradas nas fezes de duas amostras de fezes de *Rattus norvegicus* próximo da residência caso.

No item 5.5.7 foi apresentado à infecção experimental realizada em roedores dos grupos IG30, IG31 e IG32 que fizeram parte deste estudo de caso, onde ficou comprovada a infecção por *A.cantonensis* nos roedores. Na Figura 50 é possível observar a morfologia de fêmea e macho adultos de *A.cantonensis* recuperados em rato Wistar com 45 dias de infecção referente ao grupo IG32.

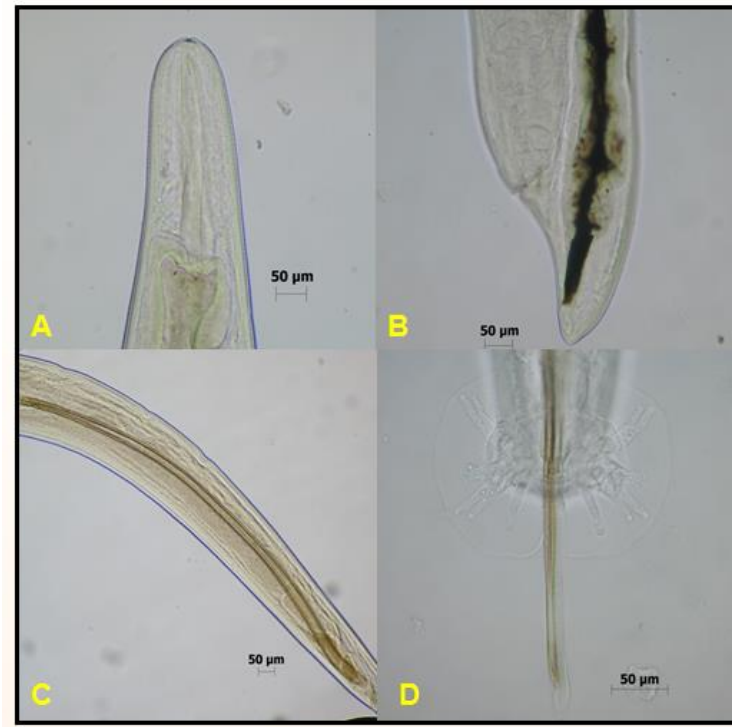


Figura 50. Morfologia de vermes adultos de *A. cantonensis* obtidos de infecção experimental a partir de L3 extraídas de moluscos da espécie *Deroceras laeve*, coletados na residência caso. **A:** Região anterior da fêmea mostrando esôfago curto e poro excretor; **B:** Região posterior da fêmea mostrando vulva e ânus; **C:** Região posterior do macho mostrando os espículos; **D:** Região posterior. **Fonte:** Melo LVC, 2015.

A partir dos resultados laboratoriais foram desencadeadas ações coordenadas entre as instituições envolvidas (IAL, Centro de Controle de Zoonoses e SUVIS Cidade Tiradentes) para a elucidação diagnóstica do paciente e a identificação do ciclo de transmissão de *Angiostrongylus cantonensis* estabelecido na zona leste da cidade de São Paulo. As experiências adquiridas, sobretudo nos casos da capital paulista, levaram a sistematização das ações envolvendo o Laboratório de Saúde Pública e as Vigilâncias, visando à resposta rápida do diagnóstico laboratorial, imediata notificação de casos e a investigação malacológica e de roedores (Figura 51).

Diagnóstico em amostras ambientais

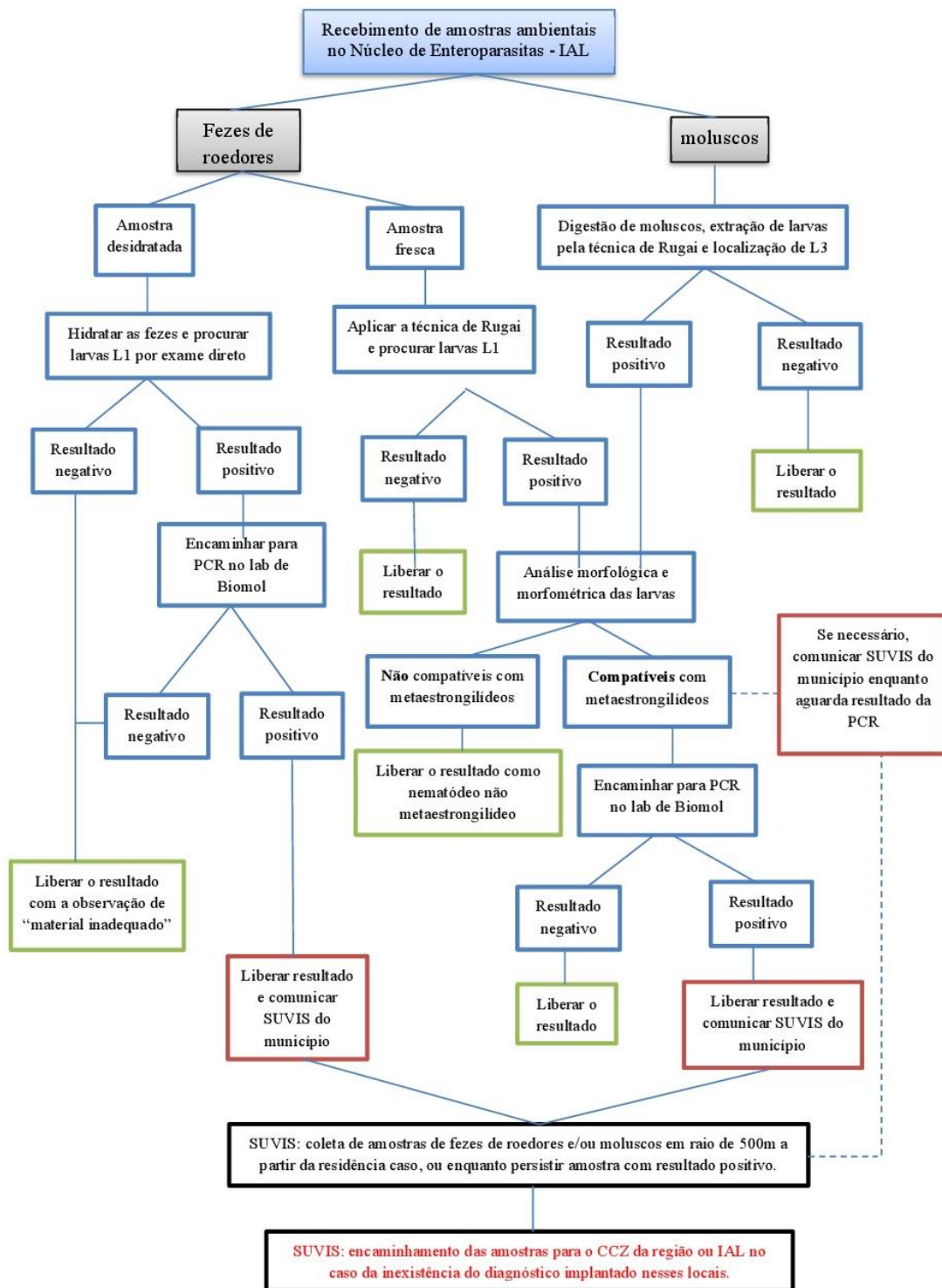


Figura 51. Fluxograma implantado no Núcleo de Enteroparasitas do IAL para detecção de *Angiostrongylus cantonensis* em amostras ambientais de fezes de roedores ou em moluscos. **Fonte:** Núcleo de Enteroparasitas - IAL, 2015.

6. DISCUSSÃO

No Brasil, a busca de novos conhecimentos sobre meningite eosinofílica causada por *A. cantonensis* está associada aos relatos recentes em humanos e a ocorrência de infecção natural em moluscos e roedores, hospedeiros intermediário e definitivo naturais, respectivamente (Caldeira et al., 2007).

O primeiro caso humano suspeito foi reportado por Moll et al. (2006), que relacionaram a evolução clínica do paciente com a ingestão de *A. fulica*. No entanto, o ano de 2007 representou o marco histórico para o reconhecimento da helmintose em nosso meio, quando foram diagnosticados dois casos de meningite eosinofílica no município de Cariacica (ES), cujo contágio foi imputado ao consumo de moluscos terrestres *in natura*. A investigação ambiental levada a efeito, no peridomicílio da residência caso, apontou o parasitismo por *A. cantonensis* em fezes de *Rattus norvegicus* e em ampla variedade de moluscos terrestres, com elevada taxa de infecção entre os espécimes (Caldeira et al., 2007).

A partir desta constatação a infecção por *A.cantonensis* passou a ser considerada no diagnóstico diferencial das meningites atípicas associadas a eosinorraquia acima de 10% (Eamsobhana, 2013) . Assim, outros casos tem sido identificados em diferentes regiões do país (Lima et al., 2009; Ciaravolo et al., 2010; Espirito-Santo et al., 2013; Morassutti et al.,2014), incluindo os apontados no presente estudo.

Segundo Stockdale Walden et al.(2017) mais de 2.800 casos da doença foram documentados em 30 países no mundo, o que pode representar apenas uma fração do total de infectados, considerando que muitos não foram relatados e/ou reconhecidos nas últimas três décadas. Apesar da meningite eosinofílica ser uma zoonose emergente no Brasil, com um cenário em expansão, é possível que o número de casos notificados e publicados também não expresse a magnitude do problema (Morassutti et al., 2014). Tal afirmativa pode explicar o fato de que o último caso notificado e investigado em São Paulo refere-se ao ano de 2015 em Cidade Tiradentes.

Estudos prospectivos foram conduzidos para demonstrar a infecção natural em moluscos e em roedores, avaliar a dispersão e traçar considerações

sobre a possível introdução do parasito no Brasil (Thiengo et al., 2010; Maldonado et al., 2010; Moreira et al., 2013; Carvalho et al., 2012). Um dos estudos de maior relevância neste sentido foi realizado por Carvalho et al. (2012) em áreas portuárias do Brasil em 28 municípios de 16 estados. Os autores relataram a presença de 19 espécies de moluscos terrestres na área de 30 portos, sendo que em 11, incluindo os de São Sebastião e Santos no litoral paulista, foi constatada a presença de quatro espécies (*Achatina fulica*, *Bradybaena similis*, *Subulina octona* e *Sarasinula marginata*) infectadas por larvas de *A. cantonensis*. Este achado reforça a hipótese de que a introdução de *A. cantonensis* no continente americano, sobretudo no sul-americano, ocorreu por meio do transporte acidental de roedores infectados em navios procedentes de áreas endêmicas de outros continentes. Yen et al. (1996), apontaram a ocorrência de metastrongilídeos parasitando roedores sinantrópicos capturados em áreas portuárias e aeroportuárias, sugerindo ser estas umas das vias de dispersão de maior importância.

Os estudos realizados no estado de São Paulo, para avaliar a participação de moluscos terrestres como hospedeiros intermediários de metastrongilídeos de interesse médico-veterinário foram voltados, exclusivamente, para *A. fulica*. Rocco (2007) realizou o primeiro estudo neste sentido em espécimes de vida livre e de criadouros procedentes de 55 áreas distribuídas em três regiões (litoral, interior e metropolitana), concluindo que *A. fulica* pode ciclar larvas de metastrongilídeos, contudo não apontando ocorrência de espécies de interesse médico. No mesmo ano, a identificação de *A. cantonensis*, similar ao padrão genético de isolado do Japão, foram relatados por Caldeira et al. (2007) em larvas recuperadas de *A. fulica* coletadas no município de São Vicente, litoral sul do estado. Com o objetivo de analisar a distribuição e o risco sanitário de *A. fulica* em municípios paulistas, Ohlweiler et al (2010) encontraram larvas de *Aelurostrongylus abstrusus* em amostras do molusco no município de Guaratinguetá, interior do estado.

Mais recentemente, Guerino et al. (2017) relataram a ocorrência de infecção natural por *A. cantonensis* em *A. fulica* em todos os municípios da Baixada Santista. Estes dados concordam com o estudo de Carvalho et al. (2012), considerando a hipótese de dispersão do parasito a partir de áreas portuárias onde houve a introdução de moluscos infectados ou roedores, além

da *A. fulica* desempenhar um papel importante como espécie hospedeira na manutenção do ciclo de vida do helminto na natureza.

O presente estudo foi o resultado das ações em vigilância no estado de São Paulo instituídas pelo Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz a partir de 2008, quando houve a implantação da análise parasitológica em moluscos terrestres urbanos provenientes de municípios da região metropolitana, litoral e interior paulista, com objetivo de avaliar o potencial de risco exercido por estes hospedeiros na saúde humana e de animais. Com isso foi possível ampliar as áreas já pesquisadas por outros autores e aumentar o conhecimento sobre a distribuição e o número de espécies envolvidas na transmissão do agravo.

Assim, o registro de infecção natural por *A. cantonensis* foi apontado em dez espécies de moluscos no município de São Paulo: *Achatina fulica*, *Bradybaena similaris*, *Belocaulus willibaldoi*, *Deroceras laeve*, *Limacus flavus*, *Lamellaxis goodalli*, *Leptinaria concentrica*, *Prohappia besckei*, *Rumina decollata* e *Sarasinula linguaeformis*; além da infecção em *Phyllocaulis variegatus* no município de Itaquaquecetuba. A infecção por *Aelurostrongylus abstrusus* foi assinalada em *Phyllocaulis boraceinsis* em Mongaguá, constituindo-se no primeiro relato para o Brasil, além da ampliação do registro do nematódeo em *A. fulica* para os municípios de Bauru e Mongaguá.

Apesar dos resultados alcançados, a amostragem por demanda espontânea ou por busca ativa, a partir da investigação de casos humanos notificados, não permite por vezes conhecer em sua totalidade as espécies de moluscos que podem estar envolvidas no ciclo de transmissão do parasito. Na investigação ambiental decorrente dos quatro casos humanos de meningite eosinofílica, confirmados laboratorialmente, do município de Mongaguá, em setembro de 2010, foram encontrados no peridomicílio moluscos das espécies *B. teinuissimus*, *A. fulica* e *P. boraceiensis*, sendo as duas últimas infectadas por *A. abstrusus*. Já na ação realizada, no mesmo período, decorrente da investigação na residência do escolar de 11 anos com quadro de cefaleia e eosinorraquia de 36% (Espírito-Santo et al., 2013) no distrito de Guarapiranga, São Paulo apenas dois espécimes de *B. willibaldoi* e um de *D. laeve* foram coletados, os quais não apresentaram infecção por metastrongilídeos. Tal fato

pode ser explicado pelo longo período de estiagem na região naquele ano. Assim, com a continuidade das ações de vigilância acredita-se que outras espécies de moluscos que não foram reportadas neste estudo possam ser reconhecidas no futuro.

Embora os moluscos terrestres estejam bem representados na biota brasileira, sabe-se que estão precariamente inventariados, sendo que os estudos mais representativos são de Morretes (1953); Salgado e Coelho (2003) e Simone (2006).

No presente estudo foi analisado, no período de sete anos, 4620 moluscos e identificadas 15 espécies. Destas, oito são consideradas exóticas: *Bradybaena similaris* (n=1338), *Achatina fulica* (n=926), *Rumina decollata* (n=817), *Deroceras laeve* (n=307), *Limacus flavus* (n=23), *Meghimatium pictum*, (n=11), *Lamellaxis goodalli* (n=9) e *Subulina octona* (n=5); e sete nativas: *Sarasinula linguaeformis* (n=634), *Belocaulus willibaldoi* (n=228), *Bulimulus tenuissimus* (n=204), *Prohappia besckei* (n=88), *Phyllocaulis boraceinsis* (n=26), *Phyllocaulis variegatus* (n=3) e *Leptinaria concentrica* (n=1), sendo que os espécimes foram provenientes de hortas, jardins, terrenos baldios, quintais e praças, coletados sob substratos naturais ou antrópicos de ambientes estritamente urbanos.

É importante ressaltar que a introdução de espécies exóticas causa impactos econômicos, sociais, ao meio ambiente e à agricultura, além de possibilitar a disseminação de parasitos para os quais atuam como hospedeiros intermediários nas regiões de origem. Tal fato tem exigido grande soma de esforço e recursos para o manejo, controle e erradicação das espécies em áreas onde têm causado prejuízos (Thomé et al., 2006; Colley e Fischer, 2009). Thiengo (2007) chama a atenção que a introdução de espécies exóticas tem sido comum e intensificada nas últimas décadas, motivada principalmente por interesses econômicos, especialmente, relacionados as atividades de maricultura, ostreicultura, helicicultura, piscicultura e aquarofilia. A introdução acidental também representa um importante fator na disseminação de moluscos, que podem migrar vários quilômetros aderidos à carrocerias de automóveis, máquinas ou

equipamentos, bem como em água de lastro, cascos de embarcações, plantas ornamentais e insumos agrícolas (Thiengo, 2007; Colley e Fischer, 2009).

Dos 4620 espécimes estudados, 3436 foram provenientes de espécies exóticas, o que correspondeu a 74,37% das amostras. Neste contexto, *Bradybaena similaris*, foi a espécie com maior número de indivíduos coletados (1293). Originária do leste da Ásia, atualmente com distribuição cosmopolita, é herbívora comum em áreas antrópicas, como: hortas, jardins, praças e áreas agrícolas sendo citada como hospedeira intermediária de *A. costaricensis* e *A.cantonensis* (Rambo et al., 1997; Caldeira et al., 2007; Oliveira et al., 2015).

Neste estudo a espécie apresentou a menor taxa de infecção 3,13% para *A.cantonensis*, considerando a análise por *pool*. Apesar disso, o resultado representou o primeiro relato da infecção desta espécie para o município. Em estudo realizado em ilhas do Havaí foi encontrada taxa de infecção de 4%, levando alguns autores a inferir que *B.similaris*, possivelmente, apresente baixa suscetibilidade a infecção por *A.cantonensis* (Kim et al., 2014). Porém este dado é discutível, pois no Brasil já foi relatado taxa de infecção de 24,6% em exemplares coletados em Trindade no Rio de Janeiro (Oliveira et al., 2015).

Achatina fulica foi a espécie de maior dispersão, assinalada em 10 municípios. Nativa do leste da África é encontrada em todos os estados brasileiros e no Distrito Federal, com exceção do estado do Acre (Moreira et al., 2013), sendo que a dispersão passiva, intencional ou acidental é o principal meio de disseminação. Este molusco tem sido considerado umas das cem piores espécies exóticas invasoras do planeta (Lowe et al., 2004), dada a sua rusticidade e seus hábitos generalistas, aliados ao elevado potencial reprodutivo e ao grande porte dos indivíduos, favorecendo sua adaptação e colonização de diferentes ambientes. Teles et al., 1997 salientam sua importância em saúde pública dado seu interesse médico-veterinário, sobretudo das angiostrongilíases humanas, tendo sido implicada como a principal transmissora de *A.cantonensis* em diferentes regiões do mundo.

Em nossas análises, das 23 amostras examinadas, 10 (43,78%) foram positivas para larvas de metastrongilídeos, porém o número de larvas recuperadas por *pool* variou de duas a 139, o que sugere baixa infecção entre

os espécimes. Três isolados de São Paulo foram identificados com *A.cantonensis*, nos bairros do Campo Grande e Freguesia do Ó. Em Bauru foi constatada a infecção por *A. abstrusus* e por uma espécie de metastrongilídeo não identificado em sete amostras provenientes de três bairros (Bom Samaritano, Parque das Nações, e Vargem Limpa), sendo assinalado o primeiro registro desses nematódeos para o município. Em Mongaguá a partir da análise em *pool* de 20 exemplares de *A.fulica*, coletadas no peridomicílio de casos suspeitos de meningoencefalite, foi constatada a infecção por *A. abstrusus*, representando o primeiro registro para o município. Estudo realizado na Baixada Santista em 2012, posterior a esta investigação, foi relatado o encontro de *A.fulica* no município de Mongaguá com infecções individuais de que variaram de seis a 3.213 larvas de *A.cantonensis* (Guerino et al.,2017).

Rumina decollata, originária da região norte do mar Mediterrâneo foi dispersa para lhas do Atlântico, África e Caribe e no continente americano. É onívora e se alimenta principalmente da decomposição de vegetais frescos e matéria orgânica, como fezes de animais. Também predam outros caracóis terrestres e suas desovas, bem como vermes de vida livre (Dundee, 1986). No país, sua presença já foi relatada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul em áreas urbanas (Thomé et al., 2006, Simone, 2006). A espécie foi citada como hospedeira intermediária de *A. cantonensis* em Cuba (Aguilar et al., 1981) e de *A. abstrusus* em Buenos Aires (Cardillo et al., 2014). Todos os exemplares de *Rumina decollata* analisados nesta investigação foram coletados no município de São Paulo. A taxa de infecção por *pool* foi de 30%, em três *pools* analisados a quantidade de larvas recuperadas foi de cinco a 10 larvas de *A.cantonensis* de moluscos coletados na zona sul de São Paulo (Parque Fernanda e Jardim Amália). Destaca-se que este foi o primeiro registro da infecção natural por *A.cantonensis* para *R.decollata* no Brasil.

Deroceras laeve, tem como área de endemismo a região paleártica e atualmente possui distribuição mundial. No Brasil é considerada praga agrícola em cultivos hortifrúti, habitam locais úmidos, sendo comuns em áreas antrópicas, periurbanas e urbanas.

A espécie foi coletada em maior quantidade no município de São Paulo, tendo sido feito o primeiro registro de ocorrência para os municípios de Pinhalzinho e São Lourenço da Serra. Ohlweiler et al. (2010a) relatam que para o estado de São Paulo há o registro de ocorrência da espécie para os municípios de Caieiras, Ribeirão Pires e São Paulo. Há o registro no país da infecção da espécie por *A.costaricensis* no município de Nova Itaberaba-Santa Catarina, com 2,7% de prevalência (Maurer et al., 2002 e Thomé et al.,2006).

Neste estudo foi feito o primeiro registro da infecção por *A.cantonensis* em *D. laeve* no Brasil a partir de coletas realizadas no bairro Parque Fernanda e Cidade Tiradentes, município de São Paulo. Foi encontrada taxa de infecção em *pool* de 20% para a espécie, porém foi a espécie em que se foi recuperado maior número de larvas que variou de uma a 1791. A espécie pôde ser relacionada com caso de meningite eosinofílica confirmado laboratorialmente em domicílio de uma criança em Cidade Tiradentes na zona leste de São Paulo. Maurer et al. (2012) ressaltam que este pequeno agriolimacideo é frequentemente encontrado entre as dobras de folhas de verduras e pode ser ingerido inadvertidamente aumentando o risco de infecção ao homem.

Limacus flavus, espécie nativa da Europa e partes adjacentes da Ásia e África foi disseminada para outras regiões por meio do comércio de mudas de plantas ornamentais e frutíferas (Wiktor,1996). A espécie é citada como praga comum em jardins, hortas e plantações e adaptada aos ambientes urbanos. No Brasil há o registro da ocorrência da espécie para os estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo, nos municípios de Guarulhos, Mauá, Ribeirão Pires, Santos e São Paulo (Ohlweiler et al .,2010a). Sua importância médica como hospedeira intermediária natural de *A.costaricensis* foi registrada nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul (Graeff-Teixeira et al., 1993). Os exemplares analisados foram coletados, exclusivamente, na cidade de São Paulo, onde foi possível recuperar 50 larvas em um único *pool* proveniente da zona sul de São Paulo. Ressaltamos que por meio deste achado, foi possível a confirmação desta espécie como mais uma nova hospedeira de *A.cantonensis*, representando o primeiro relato para o Brasil.

Meghimatium pictum ocorre na Índia, Japão e China e Indonésia, sua introdução no país possivelmente se deu na década de 1990, e passou a ser

relatada a partir do ano 2000 nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Gomes et al., 2011) em vinhedos, hortas privadas, áreas urbanas e em áreas periféricas sob troncos caídos, pedras e lixo (Baronio et al., 2014). No Paraná foi encontrada também em áreas de proteção ambiental coabitando com espécies nativas e com outros caracóis terrestres introduzidos que frequentemente são encontrados infectados com *A.costaricensis* e *A.cantonensis* (Gomes et al., 2011). Embora não tenha sido demonstrado que possa ser um hospedeiro intermediário no Brasil, Li et al.(2006) relatam *Meghimatium bicolor* como hospedeira natural de *A.cantonensis* na Província de Fujian, China. Não foram encontrados espécimes infectados por larvas de metastrongilídeos, porém foi feito o primeiro relato da ocorrência de *M. pictum* para os municípios de São Lourenço e São Paulo.

Lamellaxis goodalli originária da América Central, tendo a Jamaica como localidade tipo, seu registro atual é para toda a América do Sul, provavelmente introduzida no Brasil e em outras partes do mundo e em ilhas menores como Havaí, Cabo Verde, Santa Helena e Rodrigues (Simone, 2006). Neste estudo *L. goodalli* foi registrada somente para o bairro de Cidade Tiradentes, onde também esteve implicada na investigação de caso confirmado de meningite eosinofílica por *A.cantonensis* em uma criança. A análise em *pool* apresentou taxa de infecção de 50% permitindo a recuperação de 88 larvas de *A.cantonensis*. Desta forma, foi feito o primeiro relato da infecção natural da espécie para o Brasil.

Subulina octona, nativa da América Central possui a República Dominicana como localidade tipo, com registro para toda América do Sul (Simone, 2006). Foi encontrada naturalmente infectada por *A.cantonensis* nos estados da Bahia, Espírito Santo, Pará, Pernambuco e São Paulo (Caldeira et al., 2007; Carvalho et al., 2012). Os espécimes analisados foram todos provenientes do município de Bauru, não tendo sido reportada a infecção por larvas de metastrongilídeos.

As oito espécies exóticas identificadas neste estudo já foram descritas no país. Destas, *B. similaris*, *A. fulica* e *S. octona* já foram assinaladas no Brasil como hospedeiras de *A. cantonensis*, sendo que para as duas primeiras, a condição de espécie hospedeira para o helminto foi confirmada

neste estudo. No entanto, *D. laeve*, *R. decollata*, *L. flavus* e *L. goodalli* foram , pela primeira vez encontradas no Brasil naturalmente infectadas por *A. cantonensis*. *M. pictum* foi a única espécie deste grupo que ainda não foi comprovada a infecção natural por larvas deste parasito no país.

Seis espécies nativas foram identificadas e corresponderam a 25,66% do total estudadas, sendo quatro lesmas e dois caracóis. Dentre estas, *Sarasinula linguaeformis* teve o maior número de indivíduos coletados. Esta lesma possui registro para a região norte, nordeste, sul e sudeste do país (Thomé et al., 2006 e Simone, 2006). De acordo com dados da coleção científica do Museu de Zoologia da USP e Laboratório de Malacologia da Sucen, para o estado de São Paulo, a espécie foi registrada em Itapira, Osasco, Santa Isabel e São Paulo (Ohlweiler et al.,2010a). Foi relacionada como hospedeira intermediária de *A. costaricensis* em Nova Itaberaba, Santa Catarina (Laitano, 2001). No presente estudo, a espécie foi encontrada nos municípios de Bauru, Pinhalzinho e Monte-Mor e São Paulo. A taxa de infecção em *pool* foi de 35% para *A.cantonensis* em moluscos coletados na zona sul e norte da cidade de São Paulo. O número de larvas recuperadas variou de uma a 400 larvas L3 por *pool* analisado. A espécie esteve relacionada a uma investigação de caso confirmado de meningoencefalite no distrito do Jaçanã. Estes achados assinalam o primeiro registro de infecção natural por *A.cantonensis* para *S.linguaeformis* no Brasil.

Belocaulus willibaldoi, a espécie foi descrita em 2009 tendo a localidade tipo o bairro Parque Fernanda/São Paulo (Ohlweiler et al., 2009), porém para o estado de São Paulo sua ocorrência foi relatada nos municípios de Caieiras, Guarulhos e Osasco. É citada ainda para os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Até a realização deste estudo não havia o registro da infecção por *Angiostrongylus* spp. para a espécie, porém era tratada como hospedeira em potencial, devido ao relato de *Belocaulus angustipes* infectada por *A. costaricensis* para o Rio Grande do Sul, nos municípios de Santa Rosa e Três de Maio (Rambo et al.,1997). *B. willibaldoi* foi a segunda espécie nativa mais coletada neste estudo, tendo sido encontrada nos municípios de Pinhalzinho e São Paulo. Todas as amostras positivas para *A. cantonensis* foram coletadas no bairro Parque Fernanda,

zona sul de São Paulo. A taxa de infecção por *pool* foi de 29,41%, sendo que a recuperação de larvas variou de uma a 120 larvas. Com estes achados *B.willibaldoi* foi implicada como nova espécie hospedeira de *A.cantonensis* no Brasil, representando este o primeiro registro de sua infecção.

Bulimulus tenuissimus possui registro no país para os estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Maranhão, Pará, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo (Salgado e Coelho, 2003; Simone, 2006). Ocorre em diferentes substratos naturais e antrópicos, desde a base das plantas, e sobre o caule, galhos e folhas, além de ser frequentemente encontrado em muros e paredes de regiões periurbanas. A espécie é citada como hospedeira intermediária do trematódeo *Postharmostomum* spp., parasito de galináceos, para Minas Gerais (Thiengo e Amato, 1995). Os espécimes coletados foram provenientes, em sua maioria, do município de São Paulo, com ocorrência também para os municípios de Bauru, Mongaguá e Monte Mor. A infecção natural por larvas de metastrongilídeos ainda não foi constatada para a espécie.

Prohappia besckei é um microcaracol malácofago arborícola, tendo anteriormente sido registrada para os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina (Simone, 2006) e mais recentemente foram relatados para os estados da Bahia e Goiás (Salvador et al., 2017). Não havia registro até o presente momento na literatura de sua importância médico-veterinária. Os exemplares analisados foram provenientes do bairro Cidade Tiradentes, em São Paulo. Constitui outra espécie relacionada na investigação de caso confirmado de meningite eosinofílica por *A.cantonensis* em uma criança. A taxa de infecção para o helminto foi de 50% em análise por *pool*, com recuperação de 160 larvas L3, constituindo-se no primeiro relato de infecção natural no país.

Phyllocaulis boraceinsis é considerada a maior lesma da família Veronicellidae, podendo alcançar mais de 20 cm de comprimento. Sua ocorrência é citada para Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná. A espécie nunca foi encontrada naturalmente infectada por larvas de metastrongilídeos. Porém sua suscetibilidade a infecção por cepa de *A.costaricensis* foi testada e comprovada experimentalmente (Bonetti e Graeff-Teixeira, 1998). Os

exemplares provenientes de São Paulo não apresentaram infecção por larvas de metastrongilídeos. Um exemplar coletado em Mongaguá na residência de casos suspeitos de meningoencefalite apresentou infecção por larvas de *Aelurostrongylus abstrusus*. A taxa de infecção para espécie foi de 33,33%, com recuperação de 10 larvas. Este achado amplia a lista de espécies hospedeiras naturalmente infectadas por *A.abstrusus* para o Brasil.

Phyllocaulis variegatus foi descrita originalmente para o município de Taubaté, São Paulo. Têm sua ocorrência para o Brasil, nas regiões sudeste e sul. A espécie é tida como principal hospedeiro intermediário de *A.costaricensis* no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Graeff-Teixeira et al., 1989, Rambo et al., 1997 e Maurer et al.,2002). Neste estudo os exemplares analisados foram provenientes dos municípios de São Paulo e Itaquaquetuba. A análise de um único espécime de *P. variegatus* encaminhado de Itaquaquetuba permitiu o isolamento de 120 larvas de *Angiostrongylus cantonensis*. Tal achado permitiu o primeiro registro da infecção natural em *P.variegatus* por *A.cantonensis* no Brasil.

Leptinaria concentrica ocorre nos estados de Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina e São Paulo (Simone, 2006), sem registro de infecção natural por larvas de metastrongilídeos. No presente estudo foi coletado um exemplar de *L. concentrica* no bairro do Jaçanã, São Paulo na residência de caso confirmado de meningoencefalite, onde foi recuperada uma larva de *A.cantonensis*, sendo também o primeiro registro de infecção natural pelo parasito no Brasil.

Das sete espécies nativas coletadas, nenhuma havia sido implicada como hospedeira intermediária de *A. cantonensis*. Neste estudo, *S. linguaeformis*, *B. willibaldoi*, *P. besckei*, *P. variegatus* e *L. concentrica* foram descritas pela primeira vez portando larvas de *A. cantonensis*. *P. boraceiensis* também teve seu primeiro relato de infecção natural por *A. abstrusus*. *B. tenuissimus* foi a única espécie do grupo que ainda não foi comprovada a infecção natural por metastrongilídeos.

Pouca importância tem sido dada às características morfológicas das larvas de metastrongilídeos isoladas de hospedeiros definitivo e intermediário,

e sua aplicação no diagnóstico diferencial entre as espécies do grupo. Ash, 1970 estabeleceu parâmetros morfométricos para identificar larvas L3 de metastrongilídeos de quatro espécies de interesse médico veterinário, concluindo que as características morfológicas, quando analisadas isoladamente, não seriam um critério seguro para o diagnóstico. No entanto, demonstrou que a morfologia da cauda poderia ser usada na diferenciação das espécies estudadas.

Rocco, (2007) utilizou os parâmetros preconizados por Ash (1970) na diferenciação de larvas L3 de metastrongilídeos isoladas de *A. fulica* coletadas em diferentes regiões do estado de São Paulo. Por meio de análises multivariadas de componente principal e de discriminante canônica, foi comparado os isolados com o de referência da espécie *A. costaricensis*. Apesar dos parâmetros morfométricos estudados pelo autor não permitir a determinação de espécies do gênero *Angiostrongylus*, foi possível agrupá-los por semelhança e discriminá-los em relação ao isolado de referência.

Baseado no estudo de Rocco (2007) procurou-se fazer a análise comparativa entre os parâmetros morfométricos de 30 larvas L3 de dois isolados de referências: *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*, e posteriormente entre os 36 isolados naturais obtidos. Em 31 deles foi possível realizar todas as medidas das variáveis morfológicas das larvas L3 descritas por Ash (1970) e compará-las com os isolados de referência.

A análise comparativa entre as medidas dos isolados de referência demonstrou serem estatisticamente diferentes. Assim como apontado por Rocco (2007) foi observado que as variáveis CTC ($p < 0,001$) e DAC ($p < 0,001$) são úteis para distinguir larvas L3 das espécies *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, porém foi observado que as medidas L ($p < 0,001$), CE ($p < 0,001$), DPG ($p = 0,004$) e PG ($p = 0,002$) também apresentam poder discriminatório, sendo que somente DPE ($p = 0,355$) demonstrou similaridade entre estes isolados.

Além dos parâmetros morfométricos já descritos, o formato da cauda, como já reportado, é de grande importância taxonômica para larvas de metastrongilídeos. Esta característica associada ao esôfago do tipo

claviforme define isolados larvários da superfamília Metastrongyloidea. Segundo Ash (1970), a cauda com entalhe subterminal dorsal terminando em ponta fina ou digitiforme é característica, respectivamente, das espécies *A. cantonensis* e *A. vasorum*. O mesmo autor comparou, ainda, as caudas de outros metastrongilídeos de importância veterinária, *Aelurostrongylus abstrusus*, cuja cauda termina em ponta romba (quinóbio) e *Anafilarioides rostratus*, cuja cauda termina em ponta fina, mas com proeminente serrilhado na porção ventral da mesma. Morera (1973) na redescrição do ciclo de vida de *A. costaricensis* mostrou que a larva L3 deste parasito também apresenta cauda com ponta fina.

No presente estudo as larvas identificadas como metastrongilídeos puderam ser classificadas em grupos com três morfotipos de caudas: 423 larvas com cauda curta e pontiaguda, sugestiva de *Angiostrongylus cantonensis* (Ash, 1970 ; Thiengo et al., 2010 e Moreira et al., 2013); 94 larvas com cauda com a presença do quinóbio (botão) na porção terminal, característica de *Aelurostrongylus abstrusus* (Ash, 1970; Thiengo et al., 2008; Ohlweiler et al., 2010b e Andrade-Porto et al., 2012) e 51 larvas com cauda cônica retorcida que não foram identificadas, podendo se tratar de outras espécies de metastrongilídeo de menor ocorrência.

Para avaliar as semelhanças morfológicas entre isolados das infecções naturais de 31 grupos, com os de referências (*A. cantonensis* e *A. costaricensis*), foram utilizadas medidas referentes aos parâmetros já citados, aplicando o princípio da taxonomia numérica, que foi denominado neste estudo como análise por escore. Trata-se de processo simples em que foi atribuído valor “1” para os parâmetros coincidentes e “0” para os não coincidentes, permitindo agrupar os isolados conforme percentual de similaridade. Uma planilha dinâmica em Programa Excel facilitou a composição da matriz binária e o cálculo das similaridades. Dos 24 grupos de larvas com características sugestivas do gênero *Angiostrongylus*, quando aplicada a análise por escore, estes apresentaram maiores índices de similaridade com o isolado de referência de *A. cantonensis*. Complementarmente, a análise estatística, segundo o teste de Kruskal-Wallis, indicou que as comparações entre os isolados ambientais e os de referência foram significantes ($p < 0,001$). Do total

de grupos classificados preliminarmente como pertencentes ao gênero *Angiostrongylus*, 75% apresentaram maiores índices de similaridade (85 % a 98%) com a cepa de referência de *A.cantonensis*. Posteriormente, foi possível comprovar o diagnóstico específico de *A.cantonensis* em 20 destes isolados por meio de biologia molecular. A análise por escore apresentou aplicabilidade diagnóstica, uma vez foi possível a separação entre os grupos de larvas, representando uma ferramenta de baixo custo e complementar a vigilância das angiostrongilíases.

Dentre as amostras ambientais associadas a roedores foi possível a captura de roedores ou análise de fezes coletadas no ambiente em três bairros da cidade de São Paulo: Parque Fernanda, Jaçanã, e Cidade Tiradentes. A partir da captura de quatro roedores no Parque Fernanda, zona sul de São Paulo em 2011, foi possível à constatação da infecção por nematódeos adultos em dois *Rattus norvegicus*. Os roedores apresentaram lesões com ovos e larvas nos pulmões, além da liberação de larvas L1 nas fezes. Foram recuperados 22 vermes adultos que após as análises morfológicas e morfométricas foram identificados como sendo *A.cantonensis*. Foi procedido o isolamento do parasito em *Biomphalaria glabrata* a partir da infecção com larvas L1 obtidas das fezes de um roedor naturalmente infectados. Larvas L3 foram recuperadas dos tecidos dos moluscos após 45 dias infecção. Com a infecção experimental em ratos Wistar foi possível manter o ciclo de vida do parasito em laboratório, constituindo-se no isolado de referência.

Em relação às análises de fezes de roedores coletados em 2013 no bairro do Jaçanã de *Rattus* spp. ambas foram negativas. Em 2015, das nove amostras encaminhadas do bairro Cidade Tiradentes para análise duas amostras de fezes de *Rattus norvegicus* foram positivas para larvas L1 de nematódeo, porém estas estavam mal preservadas e foram utilizadas para identificação por meio de biologia molecular. Desta forma por meio destes achados foi possível o primeiro relato da infecção natural por *A.cantonensis* em *Rattus norvegicus* no município de São Paulo. Permitindo o registro da ampliação geográfica de hospedeiros definitivos do parasito, pois no Brasil há o relato recente da infecção pelo nematódeo para os municípios de Belém-Pará, São Gonçalo-Rio de Janeiro, e Porto Alegre-Rio Grande do Sul (Moreira et al.,2013; Cognato et al., 2013 , Simões et al., 2014), havendo ainda o

registro da infecção natural por *A.cantonensis* em *Rattus rattus* no município de Belém-Pará.

Estes dados reforçam a necessidade da investigação de novas áreas de risco de infecção pelo parasito, pois em estudo realizado no município de São Paulo por Masi *et al*, 2009 foi relatado a infestação de roedores em todas as 31 Subprefeituras do município. Em todas as áreas infestadas por roedores foi encontrada uma correlação positiva com presença de mato alto, terrenos baldios e deposição de lixo, situação que também pode favorecer a presença e proliferação de moluscos terrestres passíveis de se infectar por *A.cantonensis* ou por outros metastrongilídeos, conforme estudo realizado na Baixada Santista (Guerino, 2014).

O uso de roedores como modelos experimentais tem sido utilizado na elucidação de ciclo de metastrongilídeos (Youssif e Ibraim, 1978 e Ishii *et al.*,1980). No presente estudo esta ferramenta foi importante para recuperação de vermes a partir da infecção em dez grupos de roedores (hamsters ou ratos Wistar), com larvas de moluscos encontrados naturalmente infectados (*P. variegatus*, *S. linguaeformis*, *A. fulica*, *B.willibaldoi*, *R. decollata*, *D laeve* e *L. goodalli*). Nas infecções em hamsters com mais de cinco larvas, os parasitos jovens foram recuperados exclusivamente no SNC e causando o óbito dos animais, ainda no período pré-patente da infecção. No entanto, com número reduzido (com menos de cinco larvas), a infecção tornava-se patente, com a recuperação de vermes adultos nos pulmões.

Os dados encontrados nesta análise foram condizentes com os achados por Martin *et al.* (1983) que relatam que infecções em hamsters com mais de seis larvas de *A. cantonensis* são letais para estes animais com média de vida de 30,3 dias após infecção. Neste estudo foi possível observar que nas infecções em que foram utilizadas de 13 a 20 larvas de *A.cantonensis*, os roedores sobreviveram de 17 a 30 dias e resultou na recuperação de cinco a 16 vermes; somente em dois grupos infectados com cinco larvas os animais sobreviveram 39 dias e cinco vermes foram recuperados no pulmão havendo deposição de ovos não embrionados no tecido pulmonar. Dadas as características, o modelo não foi adequado para a manutenção do ciclo do

parasito, porém oferece informação importante em relação ao comportamento biológico, uma vez que demonstra o tropismo ao sistema nervoso central.

Nos três grupos de ratos Wistar infectados, a recuperação de vermes adultos se deu nas artérias pulmonares ou coronárias, as reações observadas decorrente da infecção foram lesões pulmonares causadas pela deposição de ovos embrionados e larvas, não tendo sido notado alterações no comportamento dos roedores. O número de larvas utilizadas para infectar os ratos foi de 15 a 30 larvas. Youssif e Ibraim (1978) relatam que roedores do gênero *Rattus* podem suportar cargas de infecção de até 100 larvas L3 de *A.cantonensis* sem comprometimento de suas funções vitais. Estudo realizado por Thiengo et al., 2010 relatou a infecção de 30 roedores com cargas de 100 larvas L3 extraídas de *A.fulica* coletadas em Olinda, permitindo a recuperação de vermes no cérebro e artérias pulmonares no intervalo de 30 a 120 dias. No presente estudo o tempo de infecção variou de 45 a 77 dias, tendo sido constatado a partir do 42º dia a liberação de larvas L1 nas fezes. A análise morfológica dos vermes adultos obtidos foram semelhantes aos encontrados por Maldonado et al., 2010; Thiengo et al., 2010 ; Moreira et al., 2013 , Cognato et al., 2013 para *A.cantonensis* isolados nas regiões Norte, Nordeste e Sul do Brasil.

Os valores morfométricos dos vermes isolados das infecções experimentais foram, para os machos de 20,01 a 22,75mm e para as fêmeas de 25,36- 35,07mm. De acordo com a literatura é possível observar uma variação no tamanho dos vermes adultos de acordo com a região geográfica e os hospedeiros envolvidos. Na descrição da espécie por Chen, 1935 (*Pulmonema cantonensis*) ao analisar os vermes (n= 6) de cada sexo, para os machos registrou tamanhos de 15,7-19mm e para fêmeas 21-25,mm . Em estudos realizados no Brasil, a partir da infecção natural em roedores ou recuperação experimental de *A.cantonensis* encontraram-se valores morfométricos para machos de 15,39- 24,9mm e para fêmeas 18,83-36,67mm (Maldonado et al., 2010; Thiengo et al., 2010 ; Moreira et al., 2013 , Cognato et al., 2013 , Monte et al., 2014).

No Brasil Caldeira et al. (2003) desenvolveram ferramenta diagnóstica a partir de técnica de PCR-RFLP para diferenciação entre *A. costaricensis*, *A. cantonensis* e *A. vasorum*. As regiões ITS2 e citocromo oxidase I de mtDNA

foram amplificadas, seguida pela digestão dos fragmentos com as enzimas de restrição RsaI e ClaI que exibiram os perfis mais discriminantes para a diferenciação das regiões COI do mtDNA e ITS2 do rDNA das espécies analisadas.

No laboratório de biologia molecular do Centro de Parasitologia e Micologia do IAL foi implantado método de biologia molecular a partir do protocolo adaptado (Caldeira et al., 2003) por PCR convencional utilizado para realizar análises de larvas e vermes obtidos de amostras ambientais de moluscos e roedores. A análise molecular foi uma importante ferramenta para confirmar os isolamentos biológicos em moluscos terrestres e roedores (larvas e vermes) como sendo de *A.cantonensis*.

A PCR confirmou o diagnóstico por *Angiostrongylus cantonensis* em dois roedores coletados na zona sul de São Paulo, e em um verme jovem (IG9) coletado no cérebro de hamster infectado experimentalmente com larvas extraídas de *B.willibaldoi*. A partir de larvas L3 extraídas de *P.variegatus* de Itaquaquecetuba foi possível à recuperação de vermes adultos e larvas L1 após inoculação em ratos Wistar, a análise molecular dessas amostras foi compatível com DNA de cepa de referência de *A.cantonensis*. Amostras de larvas L1 ressecadas de fezes de *R.norvegicus* do bairro Cidade Tiradentes foram confirmadas por meio de biologia molecular como sendo de *A.cantonensis*.

Desta forma estudos moleculares tem sido importantes para elucidar a introdução recente de *A.cantonensis* no Brasil. Caldeira et al. (2007) por meio de PCR-RFLP pôde constatar a infecção por *A.cantonensis* em pool de larvas L3 extraídas de moluscos terrestres de Cariacica-ES (*Achatina fulica*, *Sarasinula marginata*, *Subulina octona* e *Bradybaena similaris*) e de pool de larvas L1 extraídas de fezes de *R.norvegicus*. Pelo mesmo método molecular Carvalho et al. (2012) constataram a infecção por *A.cantonensis* nos seguintes moluscos terrestres (*A.fulica*, *B.similaris*, *S.marginata* e *S.octona*) a partir de áreas portuárias de diferentes regiões do Brasil. Guerino et al. (2017) utilizaram a PCR-RFLP e análises morfométricas na identificação de larvas de *A.cantonensis* em *A.fulica* nos nove municípios da Baixada Santista. Atualmente, foi desenvolvido PCR-RT baseado na

amplificação da região ITS1 com sensibilidade capaz de detectar DNA de menos de uma larva de *A.cantonensis* em tecidos de moluscos (Qvarnstrom et al., 2010).

A partir de sua distribuição original, no leste asiático, *A. cantonensis* espalhou-se ao longo de muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo inteiro durante a Segunda Guerra mundial. Esta rápida expansão geográfica coincidiu com a globalização e, provavelmente, foi facilitada pelo transporte não intencional de hospedeiros infectados em navios e aviões (Kliks e Palumbo, 1992). Quando introduzido em uma nova área o parasita pode estabelecer-se facilmente na fauna local por infectar uma variedade de hospedeiros sejam eles intermediários, paratênicos ou definitivos.

No Brasil desde a confirmação da introdução de *A.cantonensis* as seguintes espécies de moluscos terrestres foram encontradas naturalmente infectadas: *A.fulica*, *Bradybaena similis*, *Sarasinula marginata*, e *Subulina octona* e um molusco límnico, *Pomacea lineata*. As análises realizadas permitiram o registro da infecção natural em nove novas espécies encontradas em diferentes regiões do Brasil: *Belocaulus willibaldoi*, *Deroceras laeve*, *Limacus flavus*, *Lamellaxis goodalli*, *Leptinaria concentrica*, *Prohappia besckei*, *Phyllocaulis variegatus*, *Rumina decollata* e *Sarasinula linguaeformis*. Tendo sido ainda constatada a infecção natural por *A.cantonensis* em *Achatina fulica* e *Bradybaena similis*. Além do relato da infecção por *Aelurostrongylus abstrusus* em *A.fulica* e *P.boraceinsis*.

Ao contrário da população asiática, os hábitos alimentares dos brasileiros não inclui o consumo de moluscos, caracóis ou peixes crus. No entanto, crianças, pessoas com transtornos mentais, manipuladores de alimentos, pescadores e jardineiros representam grupos de risco. É de vital importância controlar as populações de moluscos e roedores e a relação destes com o meio ambiente. A ampla difusão da *A. fulica* e a diversidade de hospedeiros intermediários e definitivos de *A. cantonensis* no Brasil, representa um grande desafio para o controle efetivo da doença.

Portanto, espera-se que os resultados apresentados possam contribuir para o estabelecimento de políticas públicas voltadas as vigilâncias e ao

planejamento de ações preventivas destinadas a limitar a propagação dos hospedeiros definitivos e intermediários de *A. cantonensis* no Brasil.

7. CONCLUSÕES

- Foi possível desenvolver estudo prospectivo para avaliar a infecção natural de metastrongilídeos a partir da demanda espontânea ou busca ativa de moluscos de 15 municípios do estado de São Paulo. Foi possível a investigação da infecção em roedores por *A. cantonensis* em duas regiões da cidade de São Paulo.
- Foram identificadas 15 espécies de moluscos terrestres de áreas urbanas do estado de São Paulo, tendo sido constatada a infecção por larvas de metastrongilídeos em 12 espécies. *Aelurostrongylus abstrusus* foi encontrado infectando *A.fulica* em Bauru e *A.fulica* e *Phyllocaulis boraceinsis* no município de Mongaguá. A infecção natural por larvas de *A.cantonensis* foi constatada em 11 hospedeiros intermediários: *Achatina fulica*, *Belocaulus willibaldoi*, *Bradybaena similaris*, *Deroceras laeve*, *Leptinaria concentrica*, *Limacus flavus*, *Lamellaxis goodalli*, *Prohappia besckei*, *Phyllocaulis variegatus*, *Rumina decollata* e *Sarasinula linguaeformis*.
- Dentre oito espécies exóticas identificadas, *B. similaris*, *A. fulica* tiveram confirmação da condição de espécie hospedeira para *A.cantonensis*. As espécies, *D. laeve*, *R. decollata*, *L. flavus* e *L. goodalli* foram aqui, pela primeira vez, relatadas como hospedeiras intermediárias deste helminto.
- Das sete espécies nativas coletadas, *S. linguaeformis*, *B. willibaldoi*, *P. besckei*, *P. variegatus* e *L. concentrica* foram descritas pela primeira vez portando larvas de *A. cantonensis*. *P. boraceiensis* também teve seu primeiro relato de infecção natural por *A. abstrusus*.
- A metodologia empregada foi eficiente na obtenção de larvas de nematóides a partir dos moluscos analisados, sendo isolados três tipos de larvas de metastrongilídeos conforme morfologia da cauda, tendo sido obtidos 36 isolados infectando moluscos nos municípios de Bauru, Itaquaquetuba, Mongaguá e São Paulo. As análises morfobiológicas e morfométricas das larvas extraídas de moluscos

quando comparadas com isolados de referências de larvas L3 de *A.costaricensis* e *A.cantonensis* por análise de escore indicou maior similaridade em 24 grupos com *A.cantonensis*. A análise molecular (PCR) indicou a positividade em 20 isolados de moluscos por *A.cantonensis*. Foram feitos isolamentos em modelos experimentais a partir de 10 cujos vermes jovens e/ou adultos recuperados apresentaram morfologia compatível com *A.cantonensis*.

- A biocenose de moluscos infectados e *Rattus norvegicus* por *A.cantonensis* pode ser constatada em área urbana da zona sul de São Paulo, onde foi possível o isolamento de *A.cantonensis* em laboratório a partir de repiques sucessivos em *B.glabrata* e em ratos *Wistar*.
- A investigação de oito casos suspeitos de angiostrongilíase eosinofílica no estado de São Paulo encontrou a infecção natural em duas espécies de moluscos (*S.linguaeformis* e *L.concentrica* no bairro do Jaçanã em São Paulo; sendo também possível a constatação de biocenose de moluscos infectados (*Deroceras laeve*, *Prohappia besckei* e *Lamellaxis goodalli*) e *Rattus norvegicus* no bairro Cidade Tiradentes, na zona leste de São Paulo no peridomicílio de residência caso de uma criança com quadro de angiostrongilíase eosinofílica e ocular.
- Estas ocorrências levaram a sistematização das ações envolvendo o Laboratório de Saúde Pública e as Vigilâncias, visando à resposta rápida do diagnóstico laboratorial, imediata notificação de casos e a investigação malacológica e de roedores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases man and animals. Vol. III. Parasitoses. 3. ed. Scientific and Technical Publications N° 580, Pan American Health Organization, Regional Office of the WHO, Washington, DC: USA, 2003. 384p.
- Aguiar PH, Morera P, Pascual J. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. Am J Trop Med Hyg 1981; 30:963-965.
- Alicata JE. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. Adv Parasito 1965; 3:223-48.
- Alto W. Human infections with *Angiostrongylus cantonensis*. Pac Health Dialog 2001; 8(1):176-82.
- Anderson RC . Keys to genera of the superfamily Metastrongyloidea. In: Anderson RC, Chabaud, AG, Willmot, S. (editors). Keys to the nematode parasites of vertebrates. 1ed. Farnham Royal Wallingford, 1978.
- Anderson RC, Chabaud AG , S Willmott. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Archival Volume. CAB International, Wallingford (UK) 2009; 463p.
- Anderson RC. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. 2. ed. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000. 650p.
- Andrade-Porto SM, Souza KCP, Cárdenas MQ, Roque RA, Pimpão DM, Araújo CS et al. Occurrence of *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) larvae (Nematoda: Metastrongylidae) infecting *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) in the Amazon region. Act Amaz 2012; 42(2):245-50.
- Ash LR. *Angiostrongylus michiganensis* sp. n. (Nematoda: Metastrongyloidea). a lungworm occurring in the shrew, *Sorex cinereus*, in Michigan. J Parasitol 1967; 53: 625-629.
- Ash LR. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus* and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloides). J Parasitol 1970; 56(2):249-53.
- Ballweber, L. O Universo em expansão de três parasitas. Veter Med-Edição Portuguesa 2012; 14(82):25-32.
- Barçante, JMP, Barçante, TA, Dias, SRC, Vieira, LQ, Lima, WS , Negrão-Corrêa, D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. Parasitol Res 2003a; 89:89-93.

Barçante, T.A., Barçante, JMP, Dias, SRC, Lima, WS. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third- stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. Parasitol Res 2003b; 91: 471–475.

Barker GM. Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology. In Barker, G.M. The biology of terrestrial molluscs. Hamilton, New Zeland: CABI; 2001. p.1-146.

Baronio CA, Botton M, Gomes SR, Robinson DG. First record of qualitative losses caused by *Meghimatium pictum* in vineyards of Southern Brazil and the effects of two molluscicides for its control. Cienc Rural 2014; 44(10):1715-20.

Barratt J, Chan D, Sandaradura I, Malik R, Spielman D, Lee R et al. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. Paras 2016; 143(9):1087-118.

Barrow KO, Rose A, Lindo JF. Eosinophilic meningitis. Is *Angiostrongylus cantonensis* endemic in Jamaica? West Indian Med J. 1996;45(2):70-1.

Bender AI, Maurer RI, Silva MCF, Bem R, Terraciano PB, Silva ACA et al. Ovos e órgãos reprodutores de fêmeas de *Angiostrongylus costaricensis* são reconhecidos mais intensamente por soros humanos de fase aguda na angiostrongilíase abdominal. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36(4):449-54.

Bonetti VCBDO, Graeff-Teixeira C. *Angiostrongylus costaricensis* and the intermediate hosts: observations on elimination of L3 in the mucus and inoculation of L1 through the tegument of molluscs. Rev Soc Bras Med Trop 1998 ; 31(3):289-294.

Bonetto AA, Tassara MP. Notas sobre el conocimiento limnológico de los gasteropodos paranaenses y sus relaciones tróficas. I. Ampullaridae. Rev Ecosur 1987; 14/15 (25/26):55-62.

Bourdeau, P. L'aelurostrongylose féline. Rec de Médec Vétérinaire, 1993; 169: 409-14.

Bourque, AC, Conboy, G, Miller, LM , Whitney, H. Pathological findings in dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* in Newfoundland and Labrador, Canada. Journ of Veter Diag Investigation 2008; 20:11-20.

Bowden DK. Eosinophilic meningitis in the New Hebrides: two outbreaks and two deaths. Am J Trop Med Hyg 1981;30(5):1141-43.

Bowman DD, Lynn RC, Eberhard ML, Alcaraz A. Georgis' Parasitology for Bowman, DD, Hendrix, CM, Lindsay, DS, Barr, SC. Feline Clinical Parasitology. Iowa State University Press, 2002 .p. 267-270.

Burch JB. How to know the Eastern Land Snail. Picture Key nature Series. Dubuque, Iowa: W.M.C. Brow Company Publishers; 1962. 214p.

Caldeira RL, Carvalho OS, Mendonça CLF, Graeff-Teixeira C, Silva MC, Ben R et al. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(8):1039-43.

Caldeira RL, Mendonça CL, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS et al. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102 (7):887–889.

Cardillo N, Clemente A, Pasqualetti M, Borrás P, Rosa A, Ribicich M. Primer informe de *Aelurostrongylus abstrusus* en el caracol de tierra *Rumina decollata*, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. InVet 2014 ; 16(1): 15-22.

Carvalho OS, Scholte RGC, Mendonça, CLF, Passos LK, Caldeira RL. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in molluscs from harbour areas in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012;107(6):740-46.

Chen HT. Un nouveau nematode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n. g., n. sp., des rats de Canton. Ann Parasit Hum Comp 1935;13:312–17.

Chotmongkol V, Sawadpanitch K, Sawanyawisuth K, Louhawilai S, Limpawattana P. Treatment of eosinophilic meningitis with a combination of prednisolone and mebendazole. Am J Trop Med Hyg 2006; 74(6):1122–4.

Chotmongkol V, Sawanyawisuth K, Thavornpitak Y . Corticosteroid treatment of eosinophilic meningitis. Clin Infect Dis 2000 ; 31: 660-662.

Chotmongkol V, Wongjitrat C, Sawadpanit K, Sawanyawisuth K .Treatment of eosinophilic meningitis with a combination of albendazole and corticosteroid. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2004; 35: 172-174.

Ciaravolo RMC, Pinto PLS, Mota DJG. Meningite eosinofílica e a infecção por *Angiostrongylus cantonensis*: um agravo emergente no Brasil. Vector, Inf Téc Cient, SUCEN-SES-SP. 2010;8:7-8.

Cognato BB, Morassutti AL, Silva AA , Graeff-Teixeira, C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Rev da Soc Brasil de Med Tropical 2013 ; 46(5): 664-65.

Colley E, Fischer ML. Avaliação dos problemas enfrentados no manejo do caramujo gigante africano *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) no Brasil. Rev Bras Zool 2009 ; 26:674-704.

Conboy G. Canine angiostrongylosis: The French heartworm: An emerging threat in North America. Veter Parasitol 2011;176: 382-89.

Conboy, G. Natural infections of *Crenosoma vulpis* and *Angiostrongylus vasorum* in dogs in Atlantic Canada and their treatment with milbemycin oxime.

Cross JH. Public health importance of *Angiostrongylus cantonensis* and its relatives. Parasitol Today. 1987;3(12):367-9.

Denk D, Matiasek K, Just FT, Hermanns W, Baiker K, Herbach N, Steinberg T, Fischer, A. Disseminated angiostrongylosis with fatal cerebral haemorrhages in two dogs in Germany: A clinical case study. *Veter Parasitol* 2009 ; 160: 100–108.

Dorta-Contreras AJ, Padilla-Docal B, Moreira JM, Robles LM, Aroca JM, Alarcón F et al. Neuroimmunological findings of *Angiostrongylus cantonensis* meningitis in Ecuadorian patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2011;69(3):466-9.

Dougherty EC. The genus *Aelurostrongylus* Cameron, 1927 (Nematoda: Metastrongylidae), and its relatives; with descriptions of *Parafilaroides* gen. nov., and *Angiostrongylus gubernaculatus* sp. nov. *Proc Helm Soc Wash* 1946;13(1):16–26.

Dundee DS. Notes on the habits and anatomy of the introduced land snails, *Rumina* and *Lamellaxis* (Subulinidae). *Nautilus* 1986;100:32-7.

Dunn AM. (1978). *Veterinary Helminthology*. 2nd Ed. William Heinemann Medical Books Ltd., London ,1978, 323 p.

Eamsobhana P, Yong HS. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Int J Infect Dis* 2009; 13(4):425-31.

Eamsobhana P. Angiostrongyliasis in Thailand: epidemiology and laboratory investigations. *Hawaii J Med Public Health* 2013;72(6 Suppl 2):28-32.

Elsheikha HM, Holmes SA, Wright I, Morgan ER, Lacher DW. Recent advances in the epidemiology, clinical and diagnostic features, and control of canine cardio-pulmonary angiostrongylosis. *Vet. Res* 2014; 45(1):92.

Espírito-Santo MC, Pinto PL, Mota DJG, Gryscek RC. The first of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2013; 55(2):129-32.

Fehringer, WT, Fiedler, HH. Dois novos casos de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) do cão (*Canis familiaris*) em Salvador. *Arq. Esc. Med. Vet. Salvador* 1977;(2):110-14.

Ferdushy, T, Kapel, CMO, Webster, P, Al-Sabi, MNS , Grønvold, J. The occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in terrestrial slugs from forests and parks in the Copenhagen area, Denmark. *Journ of Helminth* 2009; 83(4): 379-83.

Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, Beveridge I. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res* 1993;.21(10):2525-6.

Giannelli A, Ramos RA, Annoscia G, Di Cesare A, Colella V, Brianti E et al. Development of the feline lungworms *Aelurostrongylus abstrusus* and *Troglostrongylus brevior* in *Helix aspersa* snails. *Parasitology* 2014; 141(4):563-9.

Giovanonni M.; Fernandez, BF.; Kavinsky, LC. Angiostrongilose do cão. Arq.

Gomes SR, Picanço JB, Colley E, Agudo-Padrón AI, Nakano E, Thomé JW. A newly introduced and invasive land slug in Brazil: *Meghimatium pictum* (Gastropoda, Philomycidae) from China. Proc Acad Nat Sci Phila 2011;161:87-95.

Gomes SR. Filogenia morfológica de Veronicellidae, filogenia molecular de *Phyllocaulis colosi* e descrição de uma nova espécie para a família (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) [tese doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

Gonçalves PC. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) novo parasita do cão do Rio Grande do Sul (Brasil). (Nematoda: Metastrongyloidea). Rev. Agron. Vet. Univ. Rio Grande do Sul 1961; 4(1):35-40.

Graeff -Teixeira C, Thomé JW, Pinto SCC, Camillo-Coura L, Lenzi HL. *Phyllocaulis variegatus*: an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1989 ; 84(1):65-8.

Graeff-Teixeira C, Agostini AA, Camillo-Coura L, Ferreira-da-Cruz MF. Seroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in Southern Brazil. Trop Med Int Health 1997; 2(3):254-60.

Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1991; 33(5):373-8.

Graeff-Teixeira C, Thiengo SC, Thomé JW, Medeiros AB, Camillo-Coura L, Agostini AA. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 in southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1993; 88(3):487-9.

Gredal, H, Willesen, JL, Jensen, HE., Nielsen, OL, Kristensen, AT, Koch, J., Kirk, RK., Pors, SE., Skerritt, GC , Berendt, M. Acute neurological signs as the predominant clinical manifestation in four dogs with *Angiostrongylus vasorum* infections in Denmark. Act Veteri Scandinavica 2011; 53: 43.

Grewal PS, Grewal SK, Tan L, Adams BJ. Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary. J Nematol. 2003;35(2):146-56.

Guerino LR, Pecora IL., Miranda M S, Aguiar-Silva C, Carvalho OS, Caldeira RL *et al* . Prevalence and distribution of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Angiostrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca, Gastropoda) in Baixada Santista, São Paulo, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 2017; 50 (1): 92-8.

Guerino LR. Ocorrência de *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Achatina fulica* (Mollusca, Gastropoda) na Baixada Santista. [tese doutorado]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Júlio de Mesquita; 2014.

Harris KR, Cheng TC. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. *Int J Parasitol* 1975;5(5):521-8.

Hawkins EC, Ettinger SJ, Suter PF. Diseases of the Lower Respiratory Tract (Lung) and Pulmonary Edema. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine (Diseases of the Dog and Cat). 3ª edição. Volume I. Editor: Ettinger, SJ, WB Saunders Company, 1989, 836p.

Helm JR, Morgan ER, Jackson, MW, Wotton P, Bell R. Canine angiostrongylosis: an emerging disease in Europe. *Journ of Veter Emerg and Critic Care* 2010; 20(1): 98-109.

Hidelaratchi MD, Riffsy MT, Wijesekera JC. A case of eosinophilic meningitis following monitor lizard meat consumption, exacerbated by anthelmintics. *Ceylon Med J* 2005; 50: 84-86.

Hughes PA, Magnet AD, Fishbain JT. Eosinophilic meningitis: a case series report and review of the literature. *Mil. Med* 2003; 168(10):817-21.

Hwang KP. Anthelmintics in the treatment of eosinophilic meningitis. *Act Paedi Sinica* 1997; 38 (Suppl.): 1-6.

Ishii AI, Kino H, Fujio Y, Sano M. Experimental light infection of *Angiostrongylus cantonensis* in hamsters. *Int J Zoonoses* 1980; 7(2):120-4.

Kim JR, Hayes KA, Yeung NW, Cowie RH . Diverse Gastropod Hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat Lungworm, Globally and with a Focus on the Hawaiian Islands, 2014 *PLoS ONE* 9(5): e94969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094969> pmid:24788772

Kino H. Parasite density and the fecundity of *Angiostrongylus cantonensis* in rats. *Parasitology* 1984 (PT 2) (2):275-85.

Kliks MM, Kroenke K, Hardman JM. Eosinophilic radiculomyeloencephalitis: an angiostrongyliasis outbreak in American Samoa related to ingestion of *Achatina fulica* snails. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31: 1114–1122.

Kliks, MM, Palumbo, NE. Eosinophilic meningitis beyond the Pacific Basin: The global dispersal of a peridomestic zoonosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the nematode lungworm of rats. *Soc Sci Med* 1992; 34,(2):199-212.

Kock J, Willesen J. Canine pulmonary angiostrongylosis: An update. *The Veter Journal* 2009; 179(3):348-59.

Koo J, Pien F, Kliks, MM. *Angiostrongylus (Parastrongylus) eosinophilic meningitis*. Rev Infect Dis 1988; 10(6):1155-62.

Kuberski T, Wallace GD. Clinical manifestations of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. Neurology 1979; 29(12):1566-70.

Kumar V, Kyprianou I, Keenan JM . Ocular angiostrongyliasis: removal of a live nematode from the anterior chamber. Eye 2005; 19: 229-230.

Lai D, Dai X, Hide G , Lun, Z. *Angiostrongylus cantonensis* and human angiostrongyliasis. 2016, University of Salford - Manchester Disponível em : <http://usir.salford.ac.uk/39006>.

Laitano, AC, Genro, JP, Fontoura,R, Branco , SSL, Maurer , RL, Graeff-Teixeira, C, Milanez, JM, Chiaradia, LA , Thomé , JW. Report on the occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in Southern Brazil, in a new intermediate host from the genus *Sarasinula* (Veronicellidae, Gastropoda) . Rev Soc Brasil de Med Tropical 2001; 34(1):95-97.

Landoni NA. Inventário de los moluscos de agua dulce de la Provincia de Buenos Aires. Comisión de investigaciones científicas, La Plata 1992; ano II, n.17, 57 p.

Langenegger J. Ocorrência da infestação por *Angiostrongylus vasorum* em cães do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1962; 7: 246-247.

Leitão JLS, Meireles, JAFS. Doenças Parasitárias do Cão e do Gato. Litexa Portugal,1983 : 35-36.

Lepri E, Veronesi F, Traversa D, Conti MB, Marchesi, MC, Miglio, A , Mandara, MT. Disseminated angiostrongylosis with massive cardiac and cerebral involvement in a dog from Italy. Parasitol Research 2011; 109(2): 505–8.

Li LS, Zhou XN, Lin JX, Zhang Y, Chen YZ, Zhang RY et al. Discovery of six new host species of *Angiostrongylus cantonensis* and investigation of the epidemic foci in Fujian province. Chin J Zoonoses 2006; 22:533-7.

Lima AR, Mesquita SD, Santos SS, Aquino ER, Rosa LR, Duarte FS et al. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. Arq Neuropsiquiatr 2009; 67(4):1093-6.

Lima, WS, Costa HMA, Guimarães, MP, Leite, ACR. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. Mem Inst Osw Cruz 1985; 80(2).233-35.

Lima, WS, Guimarães, MP, Lemos, IS. Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. J. Helminthol1994; 68:87 .

Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species

database Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN); 2004.12p.

Maldonado Júnior A, Simões RO, Oliveira AP, Motta EM, Fernandez MA, Pereira ZM et al. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(7):938-41.

Malhotra S, Mehta DK, Arora R, Chauhan D, Ray S, et al. Ocular angiostrongyliasis in a child-first case report from India. Journ of Tropic Pediatrics 2006; 52: 223-225.

Martin, OP, La Torre, PG, Gonzalez, Oviedo, MG. Infestación mortal de hámsteres (*Mesocricetus aureatus*) por *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935. Rev Cub Med Trop 1983; 35:238-241.

Masi E. Roedores da cidade de São Paulo: levantamento da taxa de infestação predial e sua relação com fatores socioeconômicos e ambientais [dissertação mestrado]. São Paulo (SP): Instituto Biológico; 2009.

Maurer RL, Graeff-Teixeira C, Thomé JW, Chiaradia LA, Sugaya H, Yoshimura K. Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca: Gastropoda) with metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. Rev Inst Med Trop São Paulo 2002; 44(1): 53-4.

Melo LCV, Mota DJG, Gava R; Pereira-Chiocola, V Pinto, PLS. Cases of eosinophilic meningitis by *Angiostrongylus cantonensis* in urban areas of São Paulo state, Brazil, from September, 2010 to September, 2016. Resumo - Anais XXV- Congresso Brasileiro de Parasitologia, 3-6 de Setembro de 2017.

Mendonça CL, Carvalho OS, Mota EM, Pelajo-Machado M, Caputo LF, Lenzi HL. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental lintermediate host (*Sarasinula marginata*). Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(4):549-56.

Mentz MB, Graeff-Teixeira C, Garrido CT. Treatment with mebendazole is not associated with migration of adult *Angiostrongylus costaricensis* in the murine experimental infection. Rev Med Trop São Paulo 2004; 46(2):73-5.

Ministério da Saúde. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica. Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2ªed. Brasília (DF): Editora do Ministério da Saúde; 2008. 178p.

Miró Corrales, G, Gómez Bautista, M Parasitosis Respiratorias y Cardiopulmonares. In: Parasitologia Veterinária. Editores: Cordero del Campillo, M. e Rojo Vasquez, F.A McGraw-Hill, Interamericana, 1999 ; 696–697p.

Moll A, Zanini G, Graeff-Teixeira C, Brasil P. Primeiros casos de meningite eosinofílica por *Angiostrongylus cantonensis* no Brasil. In V Congresso de Infectologia, Resumo ID:CI, 20. 2006.

Monte TCC, Gentile R, Garcia J, Mota E, Santos JN, Maldonado Júnior A. Brazilian *Angiostrongylus cantonensis* haplotypes, ac8 and ac9, have two different biological and morphological profiles. Mem Inst Oswaldo Cruz 2014; 109 (8): 1057-1063.

Morassutti, AL, Thiengo, SC, Fernandez, M, Sawanyawisuth, K, Graeff-Teixeira, C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. Mem do Inst Oswaldo Cruz 2014;109(4), 399-407.

Moreira VL, Giese EG, Melo FT, Simões RO, Thiengo SC, Maldonado A. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. Acta Trop 2013; 125(1):90-7.

Morera P, Céspedes R. *Angiostrongylus costaricensis* n.sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. Rev Biol Trop 1971a; 18(1-2):173-85.

Morera P, Céspedes, R. Angiostrongilosis abdominal. Una nueva parasitosis humana. Acta Med Costarric 1971b; 14:159-73.

Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. Am J Trop Med Hyg 1973; 22(5):613-21.

Morgan E , Shaw S . *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs: continuing spread and developments in diagnosis and treatment. In J Small Anim Pract 2010; 51 (12): 616–621.

Morgan ER, Shaw SE, Brennan SF, De Waal TD, Jones BR, Mulcahy G. *Angiostrongylus vasorum*: a real heartbreaker. Trends Parasitol 2005; 21(2):49-51.

Morretes FL. Adenda e corrigenda ao ensaio de catálogo dos moluscos do Brasil. Arq do Mus Paranaense 1953; 10:37-76.

Mota DJG, Pinto PLS. Necessidade de vigilância ambiental para larvas de metastrongilídeos em moluscos terrestres em áreas urbanas do Estado de São Paulo-Brasil. Bol Inst Adolfo Lutz, 2010; 20:37-8.

Mota EM, Lenzi HL. Life cycle: *Angiostrongylus costaricensis* a new proposal. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90(6):707-9.

Mota EM, Lenzi HL. *Angiostrongylus costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways based on experimental *Sigmodon hispidus* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100: 407-420.

Mota, DJG, Kawano T, Pinto PLS. Ocorrência de larvas de *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda Mestrongyloidea) em *Achatina fulica* (Mollusca Achatinidae) de áreas urbanas do Município de Bauru, Estado de São Paulo. VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo; 2009a.

Mota, DJG, Kawano T, Pinto PLS. Ocorrência de larvas de Metastrongilídeos em *Achatina* (Lissachatina) *fulica* e *Sarasinula linguaeformis* em duas áreas urbanas do Estado de São Paulo. I Encontro Latino Americano em Helmintoses. Instituto Oswaldo Cruz- Ministério da Saúde, Teresópolis, Rio de Janeiro; 2009b.

Neuhauss E, Fitarelli M, Romanzini J, Graeff-Teixeira, C. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(1):49-52.

New D, Little MD, Cross J. *Angiostrongylus cantonensis* infection from eating raw snails. N Engl J Med 1995; 332:(16) 1105-6.

Nomura S, Lin HH. First clinical case of *Haemostrongylus rattii*. Taiwan no ikai. 1945:3: 589 – 92.

Ohlweiler FP, Guimarães MC, Takahashi FY, Eduardo JM. Current distribution of *Achatina fulica*, in the State of São Paulo including records of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda) larvae infestation. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010b;52(4):211-4.

Ohlweiler FP, Mota, DJG, Gomes, SR. A new species of *Belocaulus* (Gastropoda: Veronicellidae) from southern and southeastern Brazil. The Nautilus 2009; 123 (2):34-42.

Ohlweiler FP, Takahashi FY, Guimarães MCA, Gomes SR, Kawano T. Manual de gastrópodes límnicos e terrestres do Estado de São Paulo associados às helmintoses. Porto Alegre (RS): Redes Editora; 2010a. 233 p.

Oliveira APM, Gentile R, Maldonado Júnior A, Lopes TEJ, Thiengo S C. *Angiostrongylus cantonensis* infection in molluscs in the municipality of São Gonçalo, a metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil: role of the invasive species *Achatina fulica* in parasite transmission dynamics. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015 ; 110(6):739-744.

Oliveira-Júnior SD, Barçante JM, Barçante TA, Ribeiro VM , Lima WS. Ectopic location of adult worms and first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum* in an infected dog. Veter Parasitol 2004 ;121(3-4): 293–96.

Panackel C, Vishad, Cherian G, Vijayakumar K, Sharma RN. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. Indian J Med Microbiol. 2006; 24(3):220-1.

Pascual, J, Bouli, R, Aguiar, H. Eosinophilic meningoencephalitis in Cuba, caused by *Angiostrongylus cantonensis*. The Amer Journ Trop Medic and Hygiene 1981 ; (30):960-2.

Peleteiro MC, Meireles JFS, Bento, JLS. Um caso de pneumonia parasitária em gato por *Aelurostrongylus abstrusus*. Anais da Faculdade de Medicina Veterinária, 1989; (25-26): 73-82.

Pena GPM, Andrade Filho JS, Assis SC. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the State of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. Rev Inst Med Trop São Paulo 1995;37(4),369-74.

Punyagupta S, Juttijudata P, Bunnag T. Eosinophilic meningitis in Thailand. Clinical studies of 484 typical cases probably caused by *Angiostrongylus cantonensis*. Am J Trop Med Hyg 1975; 24(6 Pt 1):92-31.

Quinn PJ, Donnelly WJC, Carter ME, Markey BKJ., Torgerson PR, Breathnach RMS. Microbial and Parasitic Diseases of the Dog and Cat. W.B. Saunders Company Ltd., Londres. p. 139, 1997.

Qvarnstrom Y, Silva AC, Teem JL, Hollingsworth R, Bishop H, Graeff-Teixeira C, Silva AJ. Improved molecular detection of *Angiostrongylus cantonensis* in mollusks and other environmental samples with a species-specific internal transcribed spacer 1-based TaqMan assay. Appl Environ Microbiol 2010; 76:5287–5289.

Rambo PR, Agostini AA, Graeff-Teixeira C. Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil - prevalence and parasitic burden in mollusc intermediate hosts from eighteen endemic foci. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92(1):9-14.

Rey L. Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 883p.

Rinaldi L, Cortese L, Meomartino L, Pagano TB, Pepe P, Cringoli C, Papparella S. *Angiostrongylus vasorum*: epidemiological, clinical and histopathological insights. BMC Vet Res 2014;10:236.

Rocco SC. Infecção natural de nematódeos parasitas em *Achatina fulica* Ferussac (Gigante africano) (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) relacionada com as condições sanitárias em vida livre e em criações comerciais no Estado de São Paulo [tese doutorado]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da SES; 2007.

Rugai E, Mattos T, Brisola AP. A new technic for the isolation of nematode larvae from feces; modification of Baermann's method. Rev Inst Adolfo Lutz 1954;14(1):5-8.

Salgado NC, Coelho ACS. Moluscos terrestres do Brasil (Gastrópodes operculados ou não, exclusive Veronicellidae, Milacidae e Limacidae). Rev Biol Trop 2003; 51(Suppl. 3):149-89.

Salvador RB, Cavallari DC, Simone LRL. Taxonomical study on a sample of land and freshwater snails from caves in central Brazil, with description of a new species. Zoosyst Evol 2017;93(1):135-41.

Sawanyawisuth K, Sawanyawisuth K. Treatment of angiostrongyliasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 990-96.

Schnyder M, Fahrion A, Ossent P, Kohler L, Webster P, Heine J, Deplazes P. Larvicidal effect of imidacloprid/moxidectin spot-on solution in dogs experimentally inoculated with *Angiostrongylus vasorum*. *Veter Parasitol* 2009; 166(3-4):326-32.

Scofield A, Madureira RC, Oliveira CJF, Guedes J, Daniel S, Soares CO, Fonseca AH. Diagnóstico pós-morte de *Aelurostrongylus abstrusus* e caracterização morfológica de ovos e mórulas por meio de histologia e impressão de tecido. *Cienc Rural* 2005; 35(4):952-55.

Simões RO, Monteiro FA, Sánchez E, Thiengo SC, Garcia JS, Costa-Neto SF. Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(7):1331-3.

Simões RO, Maldonado Júnior A, Olifiers N, Garcia JS, Bertolino AV, Luque JL. A longitudinal study of *Angiostrongylus cantonensis* in an urban population of *Rattus norvegicus* in Brazil: the influences of seasonality and host features on the pattern of infection. *Parasit Vectors* 2014; 100:1-8.

Simone LRL. Filo Mollusca: Moluscos Gastrópodes. In: Brandão CRF, Cancellato EM, organizadores. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. Vol 5: Invertebrados Terrestres. São Paulo: Fapesp; 1999. 279p.

Simone LRL. Land and freshwater mollusks of Brazil. São Paulo: EGB/Fapesp; 2006. 390p.

Sinawat S, Sanguansak T, Angkawinijwong T, Ratanapakorn T, Intapan PM, et al., Ocular angiostrongyliasis: clinical study of three cases. *Eye* 2008 ; 1446-48. Soulsby E.J.L. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7^a edição. Baillière Tindall, Londres. 1982; 278-79.

Sousa Dias V. Bronco-pneumonia verminosa dos felinos domésticos. *Revista de Medicina Veterinária*, 1945, 40, 392-395.

Spratt DM. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: A review. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2015; 4(2):178-89.

Stanisic J, Shea M, Potter D, Griffiths O. Australian Land Snails, Vol.1. A Field Guide to Eastern Australian Species. Mauritius: Bioculture Press 2010. 591p.

Stockdale Walden HD, Slapcinsky JD, Roff S, Mendieta Calle J, Diaz Goodwin Z, Stern J, et al. Geographic distribution of *Angiostrongylus cantonensis* in wild rats (*Rattus rattus*) and terrestrial snails in Florida, USA. *PLoS One* 2017; 12(5); 1-13.

Teles HMS, Vaz JF, Fontes LR, Domingos MF. Occurrence of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) in Brazil: intermediate snail host of Angiostrongyliasis. Rev Saúde Pública 1997; 31(3):310-2.

Thiengo SC, Amato, SB. *Phyllocaulis variegatus* (Mollusca: Veronicellidae), a new intermediate host for *Brachylaima* sp. (Digenea: Brachylaimatidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1995; 90(5):621-22.

Thiengo SC, Barbosa AF, Coelho PM, Fernandez MA. Moluscos exóticos com importância médica no Brasil. Brasília, I Simpósio Brasileiro Sobre Espécies Exóticas Invasoras; 2005 [acesso 2018 Fev 01]. Disponível em: www.mma.gov.br/estruturas/174/_arquivos/174_05122008104832.pdf.

Thiengo SC, Fernandez MA, Torres EJ, Coelho PM, Lanfredi RM. First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina* (Lissachatina) *fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. J Invertebr Pathol 2008; 98(1):34-9.

Thiengo SC, Maldonado A, Mota EM, Torres EJ, Caldeira R, Carvalho OS et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. Acta Trop. 2010;115(3):194-9.

Thiengo SC. Helminthoses de interesse médico-veterinário transmitidas por moluscos no Brasil. In: Santos SB, Thiengo SC, Pimenta AD, Fernandez MA, Absalão RS. Tópicos em Malacologia Ecos do XVII Encontro Brasileiro de Malacologia; 2007. p. 287-94.

Thomé JW, Gomes SR, Picanço JB. Os caracóis e as lesmas dos nossos bosques e jardins (Guia ilustrado). Pelotas : Ed. USEB; 2006.

Thomé JW, Lopes VLR. Aulas práticas de Zoologia, I. Dissecção de um molusco gastrópode desprovido de concha. Iheringia 1973;3:34-45.

Toma H, Matsumura S, Oshiro C, Hidaka T, Sato Y .Ocular angiostrongyliasis without meningitis symptoms in Okinawa, Japan. J Parasitol 2002; 88: 211-213.

Travassos, L. Nematódeos novos. Bol. Biol. São Paulo, 1927, v.6, p.52-61.

Traversa D, Guglielmini C. Feline aelurostrongylosis and canine angiostrongylosis: a challenging diagnosis for two emerging verminous pneumonia infections. Vet Parasitol 2008; 157(3-4):163-7.

Tsai HC, Lee SS, Huang CK, Yen CM, Chen ER, et al. Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan. Am JTrop Med Hyg 2004; 71: 222-226.

Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8(10):621-30.

Wiktor, A. The slugs of the former Yuogoslavia (Gastropoda terrestrial nuda- Arionidae, Milacidae, Limaciadae, Agriolimacidae). *Ann Zologici*, 1996;46:1-110.

Wilkins PP, Qvarnstrom Y, Whelen AC, Saucier C, Silva AJ, Eamsobhana P. The current status of laboratory diagnosis of *Angiostrongylus cantonensis* infections in humans using serologic and molecular methods. *Hawaii J Med Public Health* 2013; 72(6 Suppl 2):55-7.

Willesen J, Kristensen AT, Jensen AL, Heine J, Koch J. Efficacy and safety of imidacloprid/moxidectin spot-on solution and fenbendazole in the treatment of dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Veter Parasitol* 2007 ;147(3-4):258-64.

Yen CM, Wang JJ, Lee JD, Chen YP, Chen ER. Parasitic infections among wild rats from two areas of Kaohsiung. *Kaohsiung J Med Sci*1996; 12(3):145-9.

Yokogawa, S. A new species of nematode found in the lungs of rat *Haemostrongylus ratti* n.sp.now. *Trans Nat Hist Soc Formosa* 1937; 27, 247-250.

Yousif F, A Ibrahim. The first record of *Angiostrongylus cantonensis* from Egypt. *Zeitsch für Parasitenkunde* 1978; 56(1):73-80.

ANEXOS

ANEXO 1

Modelo de planilha de análise de escore de isolado natural com isolados de referência de *A. costaricensis* e *A. cantonensis*.

Anexo 1 – Comparação do grupo G31 com Isolados de Referência de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* por escore

amostra	CTC	L	CE	DPE	DAC	DPG	PG
L1	492,41	23,76	176,2	96,58	40,17	186,65	13,87
L2	497,02	24,7	187,24	88,65	45,83	161,49	14,44
L3	495,47	24,01	182,81	99,5	40,41	176,49	14,09
L4	496,8	24,62	207,73	95,33	42,33	171,98	15,35
L5	480,71	25,88	184,8	94,7	43,45	180,35	17,53
L6	471,55	26,21	179,79	95,81	42,4	172,61	17,47
L7	490	23,41	182,29	97,22	41,89	173,25	17,8
L8	483,59	23,36	176,21	97,91	39,52	165,61	15,44
L9	490,91	23,01	176,52	95,61	42,8	185,6	17,7
L10	482,31	24,56	174,32	89,12	39,98	185,02	16,77
L11	487,68	24,43	181,3	96,88	39,26	183,30	15,09
L12	485,82	24,19	175,62	91,11	39,64	175,5	10,7
L13	489,98	24,94	185,17	92,51	44,39	188,43	14,46
L14	489,18	24,61	172,32	96,96	39,28	172,22	18,24
L15	470,07	23,19	174,37	89,72	39,49	163,96	13,22
L16	498,2	28,3	181,08	79,23	40,4	173,29	16,73
L17	470,48	27,8	199,09	97,8	41,14	171,42	14,62
L18	493,1	29,21	179,55	102,8	50,39	189,07	15,01
L19	488,93	30,9	183,79	94,39	44,31	176,85	20,14
L20	473,68	30,5	183,71	94,14	38,32	180,75	14,54
L21	480,75	30,65	181,55	102,92	41,64	165,26	16,71
L22	473,65	31,77	179,38	92,6	43,86	188,49	15,88
L23	444,67	28,45	178,2	82,23	41,28	160,17	13,99
L24	480,04	28,76	174,67	96,76	43,02	169,38	16,47
L25	517,48	26,39	177,73	102,34	42,56	190,24	15,35
L26	480,18	29,08	180,6	95,29	41,75	183,59	17,21
L27	499,94	28,46	187,34	102,85	44,95	163,99	16,35
L28	471,16	29,7	200,66	93,09	45,42	179,22	13,61
L29	453,5	28,59	176,75	91,64	41,02	163,32	15,81
L30	487,77	28,3	180,97	95,94	41,44	160,41	15,99
média	481,90	28,72	182,06	94,72	42,08	175,26	15,68
mediana	481,63	26,30	180,79	95,47	41,70	174,40	15,63
Desv. Pad	14,95	2,70	8,03	5,42	2,53	9,50	1,85
intervalo <	444,67	23,01	172,32	79,23	38,32	160,17	10,70
intervalo >	517,48	31,77	207,73	102,95	50,39	190,24	20,14

nº larvas analisadas			
30			

RESULTADO <i>Angiostrongylus cantonensis</i>			
Referência	escores possíveis	var	%
referência IAL	210	7	90,48

RESULTADO <i>Angiostrongylus costaricensis</i>			
Referência	escores possíveis	var	%
referência IAL	210	7	30,00

ANEXO 2

Modelo de planilha de análise de escore de isolado natural com isolado de referência de *A.cantonensis*.

Grupo G31 comparado com isolado de referência <i>A. cantonensis</i> IAL														
amostra	CTC	score	L	score	CE	score	DPE	score	DAC	score	DPG	score	PG	score
L1	492,41	1	23,76	1	176,2	1	96,58	1	40,17	1	186,65	1	13,87	1
L2	497,02	1	24,7	1	187,24	0	88,65	1	45,83	0	161,49	1	14,44	1
L3	495,47	1	24,01	1	182,81	1	99,5	0	40,41	1	176,49	1	14,09	1
L4	496,8	1	24,62	1	207,73	0	95,33	1	42,33	1	171,98	1	15,35	1
L5	480,71	1	25,88	1	184,8	0	94,7	1	43,45	1	180,35	1	17,53	1
L6	471,55	1	26,21	1	179,79	1	95,81	1	42,4	1	172,61	1	17,47	1
L7	490	1	23,41	1	182,29	1	97,22	1	41,89	1	173,25	1	17,8	1
L8	483,59	1	23,36	1	176,21	1	97,91	1	39,52	1	165,61	1	15,44	1
L9	490,91	1	23,01	1	176,52	1	95,61	1	42,8	1	185,6	1	17,7	1
L10	482,31	1	24,56	1	174,32	1	89,12	1	39,98	1	185,02	1	16,77	1
L11	467,68	1	24,43	1	181,3	1	96,88	1	39,26	1	183,3	1	15,09	1
L12	465,82	1	24,19	1	175,62	1	91,11	1	39,64	1	175,5	1	10,7	0
L13	489,98	1	24,94	1	185,17	0	92,51	1	44,39	1	188,43	1	14,46	1
L14	469,18	1	24,61	1	172,32	1	96,96	1	39,28	1	172,22	1	18,24	1
L15	470,07	1	23,19	1	174,37	1	89,72	1	39,49	1	163,96	1	13,22	1
L16	498,2	1	28,3	1	181,08	1	79,23	1	40,4	1	173,29	1	16,73	1
L17	470,48	1	27,8	1	199,09	0	97,8	1	41,14	1	171,42	1	14,62	1
L18	493,1	1	29,21	1	179,55	1	102,8	0	50,39	0	189,07	1	15,01	1
L19	488,93	1	30,9	1	183,79	1	94,39	1	44,31	1	176,85	1	20,14	1
L20	473,68	1	30,5	1	183,71	1	94,14	1	38,32	1	180,75	1	14,54	1
L21	480,75	1	30,65	1	181,55	1	102,92	0	41,64	1	165,26	1	16,71	1
L22	473,65	1	31,77	0	179,38	1	92,6	1	43,86	1	188,49	1	15,88	1
L23	444,67	1	28,45	1	178,2	1	82,23	1	41,28	1	160,17	1	13,99	1
L24	480,04	1	28,76	1	174,67	1	96,76	1	43,02	1	169,38	1	16,47	1
L25	517,48	0	26,39	1	177,73	1	102,34	0	42,56	1	190,24	1	15,35	1
L26	480,18	1	29,08	1	180,6	1	95,29	1	41,75	1	183,59	1	17,21	1
L27	499,94	0	28,46	1	187,34	0	102,95	0	44,95	0	163,99	1	16,35	1
L28	471,16	1	29,7	1	200,66	0	93,09	1	45,42	0	179,22	1	13,51	1
L29	453,5	1	28,59	1	176,75	1	91,64	1	41,02	1	163,32	1	15,81	1
L30	487,77	1	28,3	1	180,97	1	95,94	1	41,44	1	160,41	1	15,99	1
média	481,90	28	26,72	29	182,06	23	94,72	25	42,08	26	175,26	30	15,68	29
intervalo <	444,67	347	23,01	19,68	172,32	139,29	79,23	63,34	38,32	23,48	160,17	92,38	10,70	10,81
intervalo >	517,48	499,71	31,77	31,01	207,73	184,08	102,95	98,52	50,39	44,43	190,24	196,15	20,14	24,33

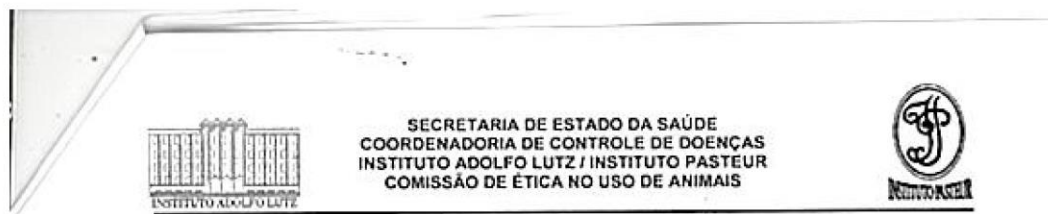
ANEXO 3

Modelo de planilha de análise de escore de isolado natural com isolado de referência de *A.costaricensis*.

Grupo G31 comparado com isolado de referência <i>A. costaricensis</i> IAL														
amostra	CTC	score	L	score	CE	score	DPE	score	DAC	score	DPG	score	PG	score
L1	492,41	0	23,76	1	176,2	0	96,58	0	40,17	0	186,65	0	13,87	1
L2	497,02	0	24,7	1	187,24	0	88,65	1	45,83	0	161,49	0	14,44	1
L3	495,47	0	24,01	1	182,81	0	99,5	0	40,41	0	176,49	0	14,09	1
L4	496,8	0	24,62	1	207,73	0	95,33	0	42,33	0	171,98	0	15,35	1
L5	480,71	0	25,88	1	184,8	0	94,7	1	43,45	0	180,35	0	17,53	0
L6	471,55	0	26,21	1	179,79	0	95,81	0	42,4	0	172,61	0	17,47	0
L7	490	0	23,41	1	182,29	0	97,22	0	41,89	0	173,25	0	17,8	0
L8	483,59	0	23,36	1	176,21	0	97,91	0	39,52	0	165,61	0	15,44	1
L9	490,91	0	23,01	0	176,52	0	95,61	0	42,8	0	185,6	0	17,7	0
L10	482,31	0	24,56	1	174,32	0	89,12	1	39,98	0	185,02	0	16,77	0
L11	467,68	0	24,43	1	181,3	0	96,88	0	39,26	0	183,3	0	15,09	1
L12	465,82	0	24,19	1	175,62	0	91,11	1	39,64	0	175,5	0	10,7	0
L13	489,98	0	24,94	1	185,17	0	92,51	1	44,39	0	188,43	0	14,46	1
L14	469,18	0	24,61	1	172,32	0	96,96	0	39,28	0	172,22	0	18,24	0
L15	470,07	0	23,19	1	174,37	0	89,72	1	39,49	0	163,96	0	13,22	1
L16	498,2	0	28,3	1	181,08	0	79,23	1	40,4	0	173,29	0	16,73	0
L17	470,48	0	27,8	1	199,09	0	97,8	0	41,14	0	171,42	0	14,62	1
L18	493,1	0	29,21	1	179,55	0	102,8	0	50,39	0	189,07	0	15,01	1
L19	488,93	0	30,9	1	183,79	0	94,39	1	44,31	0	176,85	0	20,14	0
L20	473,68	0	30,5	1	183,71	0	94,14	1	38,32	0	180,75	0	14,54	1
L21	480,75	0	30,65	1	181,55	0	102,92	0	41,64	0	165,26	0	16,71	0
L22	473,65	0	31,77	1	179,38	0	92,6	1	43,86	0	188,49	0	15,88	1
L23	444,67	1	28,45	1	178,2	0	82,23	1	41,28	0	160,17	1	13,99	1
L24	480,04	0	28,76	1	174,67	0	96,76	0	43,02	0	169,38	0	16,47	0
L25	517,48	0	26,39	1	177,73	0	102,34	0	42,56	0	190,24	0	15,35	1
L26	480,18	0	29,08	1	180,6	0	95,29	0	41,75	0	183,59	0	17,21	0
L27	499,94	0	28,46	1	187,34	0	102,95	0	44,95	0	163,99	0	16,35	0
L28	471,16	0	29,7	1	200,66	0	93,09	1	45,42	0	179,22	0	13,51	1
L29	453,5	1	28,59	1	176,75	0	91,64	1	41,02	0	163,32	0	15,81	1
L30	487,77	0	28,3	1	180,97	0	95,94	0	41,44	0	160,41	1	15,99	1
média	481,90	2	26,72	29	182,06	0	94,72	13	42,08	0	175,26	2	15,68	17
intervalo <	444,67	391,51	23,01	23,02	172,32	142,77	79,23	77,13	38,32	25,99	160,17	129,97	10,70	10,95
intervalo >	517,48	461,64	31,77	34,42	207,73	166,66	102,95	95,15	50,39	35,38	190,24	160,86	20,14	16

ANEXO 4

Parecer de comissão de ética no uso de animais



São Paulo, 28 de agosto de 2012.

Parecer CEUA-IAL/Pasteur n° 04/2012

Prezada Senhora,


Vimos pelo presente informar que o projeto de pesquisa "Ecoepidemiologia e Diagnóstico Laboratorial das Angiostrogiliasis", sob coordenação do Dr. Pedro Luiz da Silva Pinto e da Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola, foi considerado **APROVADO**, podendo ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

Os conhecimentos sobre as infecções causadas por metastrongilídeos no Brasil são pouco difundidos e muito restritos, sendo necessário estabelecer diagnósticos clínicos e laboratoriais mais precisos.

Vale ressaltar que o emprego que a metodologia descrita no estudo para o isolamento de parasitas é reconhecidamente utilizada em diversos outros laboratórios e os modelos utilizados são adequados à metodologia, além da equipe possuir larga experiência no uso de animais

Informamos que devem ser encaminhados relatórios à CEUA a cada **6 (seis) meses**, no intuito de acompanhar os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e encaminhar ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,


Adriano Abbud
Coordenador
CEUA-IAL/Pasteur

Ilmos. Srs.
Dr. Pedro Luiz da Silva Pinto
Dra. Vera Lucia Pereira Chioccola
Pesquisadores Científicos
Centro de Parasitologia e Micologia
Instituto Adolfo Lutz

AA/aa

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, n° 355
10° Andar – Salas 1019/1020 – Cerqueira César
São Paulo – SP – CEP: 01246-902
Tel: (11) 3068-2881 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

ANEXOS 5 – 15

ANEXO 5

Tabelas com dados morfométricos dos isolados naturais em moluscos terrestres de diferentes regiões do estado de São Paulo

Tabela 1. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Belocaulus willibaldoi* do Parque Fernanda- São Paulo em janeiro de 2011.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG3	<i>Angiostrongylus</i> spp.	30	CTC	421,19	24,86	377,73-461,05
			L	22,38	1,62	18,04-25,96
			CE	153,88	10,66	135,30-173,21
			DPE	75,15	7,34	58,12-93,03
			DAC	32,93	2,63	28,31-39,08
			DPG	149,22	11,25	125,20-171,64
			PG	11,56	1,61	8,68-15,71

Tabela 2. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Phyllocaulis variegatus* proveniente do município de Itaquaquecetuba - São Paulo em julho de 2012.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG4	<i>Angiostrongylus</i> spp.	28	CTC	456,35	21,21	397,77-497,58
			L	25,74	1,39	22,86-29,06
			CE	163,66	9,49	139,22-179,07
			DPE	82,15	8,17	66,60-95,58
			DAC	39,58	3,06	34,81-45,11
			DPG	163,25	21,03	116,99-199,78
			PG	12,83	2,39	9,45-18,91

Tabela 3. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Sarasinula linguaeformis* proveniente do bairro do Jaçanã-São Paulo em março de 2013.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG5	<i>Angiostrongylus</i> spp.	30	CTC	410,02	14,79	383,12-432,69
			L	23,80	1,58	21,14-28,61
			CE	153,76	7,41	139,60-167,78
			DPE	81,56	3,61	74,19-88,68
			DAC	35,42	2,76	29,44-42,23
			DPG	140,26	7,63	124,48-155,32
			PG	13,45	2,34	9,48-19,47

ANEXO 6

Tabela 4. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Sarasinula linguaeformis* proveniente do bairro do Parque Fernanda-São Paulo em março de 2010.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG6	<i>Angiostrongylus</i> spp.	18	CTC	455,17	28,06	401,65-501,79
			L	25,47	4,92	20,67-38,76
			CE	164,94	11,86	139,65-185,50
			DPE	91,18	5,78	79,35-100,33
			DAC	36,79	4,04	30,89-43,91
			DPG	160,03	13,29	139,90-183,61
			PG	11,99	2,58	8,46-18,10

Tabela 5. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Sarasinula linguaeformis* proveniente do bairro do Parque Fernanda-São Paulo em dezembro de 2010.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG7	<i>Angiostrongylus</i> spp.	14	CTC	480,19	22,16	455,06-516,74
			L	28,37	3,38	24,04-36,14
			CE	169,99	6,22	159,28-180,29
			DPE	94,83	5,43	88,71-106,29
			DAC	38,80	2,34	36,07-42,89
			DPG	172,58	6,01	166,00-184,53
			PG	13,61	2,46	8,84-17,21

Tabela 6 Morfometria das larvas L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do bairro de Campo Grande-São Paulo em fevereiro de 2013.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG8	<i>Angiostrongylus</i> spp.	4	CTC	397,76	30,13	366,54-437,97
			L	21,33	1,37	19,62-22,93
			CE	159,45	15,31	140,72-177,88
			DPE	74,57	7,73	70,27-86,13
			DAC	33,41	2,55	29,88-35,90
			DPG	142,14	7,47	131,95-149,78
			PG	11,17	1,93	9,56-13,72

ANEXO 7

Tabela 7. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Belocaulus willibaldoi* proveniente do bairro Parque Fernanda-São Paulo em fevereiro de 2011.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG9	<i>Angiostrongylus</i> spp.	27	CTC	429,98	27,83	350,26-462,81
			L	24,55	2,08	21,31-29,21
			CE	156,30	11,78	127,81-176,42
			DPE	77,21	5,30	68,64-90,55
			DAC	34,07	2,70	26,41-38,21
			DPG	153,48	10,29	123,87-167,42
			PG	12,03	1,88	8,13-15,91

Tabela 8. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Limacus flavus* proveniente do bairro Parque Fernanda-São Paulo em março de 2010.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG10	<i>Angiostrongylus</i> spp.	30	CTC	422,05	20,11	376,09-451,69
			L	23,38	1,87	21,46-29,80
			CE	153,39	7,95	134,02-165,50
			DPE	82,94	5,37	73,51-92,22
			DAC	36,63	2,47	32,29-42,10
			DPG	153,58	10,23	116,30-172,34
			PG	13,68	1,77	10,22-19,13

Tabela 9. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do bairro da Freguesia do Ó - São Paulo em setembro de 2013.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG11	<i>Angiostrongylus</i> spp.	30	CTC	387,58	16,83	353,76-415,63
			L	21,74	1,06	19,73-24,25
			CE	143,41	6,94	133,56-156,64
			DPE	68,26	4,88	56,36-81,76
			DAC	32,24	2,41	28,56-38,57
			DPG	137,09	9,00	105,15-148,57
			PG	11,05	1,54	7,51-14,03

ANEXO 8

Tabela 10. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Sarasinula linguaeformis* proveniente do bairro Parque Fernanda - São Paulo em setembro de 2013.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG15	<i>Angiostrongylus</i> spp.	10	CTC	479,96	25,77	432,67-518,21
			L	26,14	1,87	24,13-29,50
			CE	171,62	16,12	150,61-205,60
			DPE	93,10	6,46	79,99-98,43
			DAC	37,78	3,23	33,22-42,13
			DPG	172,19	11,09	158,79-194,43
			PG	12,51	2,35	10,67-17,73

Tabela 11. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Sarasinula linguaeformis* proveniente do bairro Parque Fernanda - São Paulo em janeiro de 2009.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG16	<i>Angiostrongylus</i> spp.	6	CTC	377,56	5,81	369,05-385,29
			L	19,57	0,90	18,27-20,49
			CE	140,13	9,28	126,03-152,55
			DPE	74,22	3,52	70,68-79,67
			DAC	29,97	1,65	26,97-31,82
			DPG	130,25	7,02	120,35-138,80
			PG	10,88	0,76	10,14-12,11

Tabela 12. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Sarasinula linguaeformis* proveniente do bairro Parque Fernanda - São Paulo em janeiro de 2011.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG17	<i>Angiostrongylus</i> spp.	17	CTC	435,51	21,22	376,82-465,96
			L	29,06	2,79	24,59-34,78
			CE	167,02	7,03	153,58-178,34
			DPE	82,43	4,46	72,97-87,47
			DAC	35,81	2,37	30,00-39,60
			DPG	157,78	10,06	130,80-172,36
			PG	12,06	1,60	10,00-16,52

ANEXO 9

Tabela 13. Morfometria de larva L3 isolada de *Sarasinula linguaeformis* proveniente do bairro Parque Fernanda - São Paulo em dezembro de 2008.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Valor em μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG18	<i>Angiostrongylus</i> spp.	1	CTC	515,75	-	-
			L	22,55	-	-
			CE	191,94	-	-
			DPE	98,05	-	-
			DAC	43,85	-	-
			DPG	182,91	-	-
			PG	19,83	-	-

Tabela 14. Morfometria das larvas L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do bairro da Freguesia do Ó - São Paulo em setembro de 2013.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG19	<i>Angiostrongylus</i> spp.	22	CTC	402,82	33,59	338,22-456,41
			L	23,20	1,61	20,15-26,10
			CE	149,67	11,09	129,94-168,48
			DPE	72,82	8,89	57,41-91,50
			DAC	29,59	3,48	24,13-34,88
			DPG	138,59	17,18	98,58-164,50
			PG	11,88	1,86	9,75-16,31

Tabela 15. Morfometria de larvas L3 isoladas de *Rumina decollata* proveniente do bairro Parque Fernanda- São Paulo em setembro de 2009.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de Variação
IG20	<i>Angiostrongylus</i> spp.	7	CTC	436,68	44,94	394,13-524,03
			L	28,07	3,30	25,83-35,21
			CE	167,10	17,71	137,35-186,84
			DPE	85,37	7,79	78,42-99,21
			DAC	37,51	3,35	34,13-43,05
			DPG	163,21	13,21	145,01-179,61
			PG	13,92	2,44	11,30-17,56

ANEXO 10

Tabela 16. Morfometria de larvas L3 isoladas de *Deroceras laeve* proveniente do Parque Fernanda- São Paulo em setembro de 2009.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG21	<i>Angiostrongylus</i> spp.	2	CTC	518,49	4,29	515,46-521,52
			L	29,38	1,52	28,30-30,45
			CE	184,53	0,37	184,27-184,79
			DPE	101,39	1,52	100,31-102,46
			DAC	43,81	0,57	43,41-44,21
			DPG	196,64	4,32	193,58-199,69
			PG	11,27	0,77	10,72-11,81

Tabela 17. Morfometria de larva L3 isoladas de *Leptinaria concentrica* proveniente do bairro do Jaçanã - São Paulo em março de 2013.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Valor μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG24	<i>Angiostrongylus</i> spp.	1	CTC	381,41	-	-
			L	18,68	-	-
			CE	147,96	-	-
			DPE	68,97	-	-
			DAC	32,31	-	-
			DPG	139,33	-	-
			PG	11,73	-	-

Tabela 18. Morfometria de larva L2 isoladas de *Belocaulus willibaldoi* proveniente do bairro do Jardim Amália - São Paulo em março de 2013.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Valor μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG25	<i>Angiostrongylus</i> spp.	1	CTC	549,42	-	-
			L	29,39	-	-
			CE	203,78	-	-
			DPE	107,78	-	-
			DAC	46,19	-	-
			DPG	209,14	-	-
			PG	14,00	-	-

ANEXO 11

Tabela 19. Morfometria de larva L3 isoladas de *Rumina decollata* proveniente do bairro do Jardim Amália - São Paulo em abril de 2013.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG27	<i>Angiostrongylus</i> spp.	10	CTC	407,05	15,18	383,60-431,97
			L	23,00	0,70	22,08-24,50
			CE	157,72	7,79	140,26-166,26
			DPE	76,77	5,79	66,93-85,89
			DAC	33,03	1,44	31,31-35,09
			DPG	146,55	7,07	137,49-156,67
			PG	11,54	1,16	9,64-13,36

Tabela 20. Morfometria de larva L3 isoladas de *Rumina decollata* proveniente do bairro do Jardim Amália - São Paulo em abril de 2013.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de Variação
IG28	<i>Angiostrongylus</i> spp.	5	CTC	399,19	51,06	339,08-469,93
			L	22,98	2,18	20,41-26,42
			CE	155,99	9,04	145,04-166,19
			DPE	70,21	2,57	65,85-72,68
			DAC	32,37	4,06	28,43-37,90
			DPG	141,66	17,73	121,03-160,20
			PG	11,37	1,42	10,02-12,95

Tabela 21. Morfometria de larva L3 isoladas de *Bradybaena similaris* proveniente do bairro Parque Fernanda - São Paulo em janeiro de 2011.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG29	<i>Angiostrongylus</i> spp.	3	CTC	471,76	14,26	457,45-485,96
			L	26,09	1,05	25,06-27,15
			CE	167,61	12,81	156,96-181,82
			DPE	79,26	0,91	78,36-80,18
			DAC	33,27	2,12	31,46-35,60
			DPG	162,35	30,17	132,63-192,96
			PG	11,23	2,72	8,14-13,26

ANEXO 12

Tabela 22. Morfometria de larva L3 isoladas de *Deroceras laeve* proveniente do bairro Cidade Tiradentes - São Paulo em setembro de 2015.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG30	<i>Angiostrongylus</i> spp.	30	CTC	481,90	14,95	444,67-517,48
			L	26,72	2,70	23,01-31,77
			CE	182,06	8,03	172,32-207,73
			DPE	94,72	5,42	79,23-102,95
			DAC	42,08	2,53	38,32-50,39
			DPG	175,26	9,50	160,17-190,24
			PG	15,68	1,85	10,70-20,14

Tabela 23. Morfometria de larva L3 isoladas de *Lamellaxis goodalli* proveniente do bairro Cidade Tiradentes - São Paulo em setembro de 2015.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG31	<i>Angiostrongylus</i> spp.	30	CTC	477,79	21,07	443,13-521,87
			L	26,86	2,27	22,05-30,19
			CE	175,36	9,53	162,13-195,24
			DPE	92,05	4,50	84,35-100,25
			DAC	40,49	1,87	37,78-43,68
			DPG	179,92	8,31	164,28-193,84
			PG	13,05	1,59	10,32-17,23

Tabela 24. Morfometria de larva L3 isoladas de *Deroceras laeve* proveniente do bairro Cidade Tiradentes - São Paulo em setembro de 2015.

Grupo	Espécie	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG32	<i>Angiostrongylus</i> spp.	30	CTC	496,46	14,88	462,90-530,68
			L	24,83	1,51	22,57-27,67
			CE	180,25	10,75	152-195,64
			DPE	87,54	7,19	73,13-100,13
			DAC	40,53	2,71	34,41-46,10
			DPG	175,26	11,75	150,59-197,69
			PG	13,14	3,20	8,62-22,15

ANEXO 13

Tabela 25. Morfometria de larva L3 isoladas de *Prohappia besckei* proveniente do bairro Cidade Tiradentes - São Paulo em novembro de 2015.

Grupo	Espécie	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de Variação
IG33	<i>Angiostrongylus</i> spp.	30	CTC	515,90	19,23	465,71-547,08
			L	25,74	1,01	23,83-27,79
			CE	186,52	6,29	172,68-196,81
			DPE	99,87	5,45	88,00-107,39
			DAC	42,04	2,24	37,67-46,98
			DPG	187,55	8,78	166,78-202,19
			PG	14,12	2,37	10,74-19,91

Tabela 26. Morfometria de larva L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do bairro Parque das Nações - Bauru em janeiro de 2009

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG1	<i>A. abstrusus</i>	30	CTC	382,75	27,85	342,97-450,88
			L	18,82	1,50	16,21-21,87
			CE	148,59	11,86	116,43-169,84
			DPE	69,06	5,32	61,31-80,43
			DAC	24,97	2,55	20,31-30,09
			DPG	131,29	12,14	110,34-159,01
			PG	8,15	1,29	5,65-10,95

Tabela 27. Morfometria de larva L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do município de Mongaguá em novembro de 2010.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG2	<i>A. abstrusus</i>	27	CTC	535,39	51,30	385,24-631,49
			L	27,21	2,91	24,66-38,09
			CE	206,00	22,53	135,78-238,89
			DPE	95,69	7,71	77,44-108,87
			DAC	36,18	4,51	24,64-46,53
			DPG	172,86	18,35	112,14-203,48
			PG	10,48	1,79	7,00-13,87

ANEXO 14

Tabela 28. Morfometria de larva L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do bairro Bom Samaritano- Bauru em janeiro de 2012.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG13a	<i>A.abstrusus</i>	30	CTC	501,00	24,47	457,79-582,93
			L	27,82	1,50	25,56-32,32
			CE	192,76	11,96	170,20-219,06
			DPE	88,74	3,80	83,90-99,30
			DAC	33,46	2,26	29,64-39,09
			DPG	169,00	9,94	143,39-190,15
			PG	10,85	1,80	8,00-14,69

Tabela 29. Morfometria de larva L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do bairro Parque das Nações- Bauru em janeiro de 2012.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG14a	<i>A.abstrusus</i>	7	CTC	545,60	18,24	526,98-570,42
			L	26,68	1,84	23,77-29,09
			CE	209,03	6,09	202,49-218,66
			DPE	100,63	4,10	96,03-105,50
			DAC	37,51	1,94	35,40-39,92
			DPG	171,53	19,46	144,70-191,63
			PG	10,77	1,45	8,69-12,69

Tabela 30. Morfometria de larva L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do Zoológico de Bauru em fevereiro de 2012.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	\pm DP	Intervalo de variação
IG12	Não identificada	30	CTC	447,24	29,84	384,79-501,12
			L	32,36	3,55	28,13-39,78
			CE	147,53	7,34	136,34-160,93
			DPE	63,57	2,62	59,02-69,27
			DAC	31,58	2,87	26,03-41,40
			DPG	142,28	14,74	106,96-171,91
			PG	14,40	3,42	8,66-26,23

ANEXO 15

Tabela 31. Morfometria de larva L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do CCZ de Bauru em fevereiro de 2012.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média	± DP	Intervalo de Variação
IG13b	Não identificada	19	CTC	307,06	11,62	280,55-323,19
			L	16,87	1,14	15,70-19,98
			CE	117,48	4,40	106,47-124,44
			DPE	62,45	1,70	60,03-65,15
			DAC	26,77	1,98	21,33-28,55
			DPG	111,41	4,80	97,28-117,91
			PG	9,64	1,17	7,67-12,04

Tabela 32. Morfometria de larva L3 isoladas de *Achatina fulica* proveniente do bairro Parque das Nações Bauru em fevereiro de 2012.

Grupo	Espécie suspeita	Larvas (n)	Variáveis	Média μm	± DP	Intervalo de variação
IG14b	Não identificada	2	CTC	512,17	41,84	482,58-541,75
			L	33,06	0,70	32,56-33,55
			CE	132,58	95,16	65,29-199,86
			DPE	83,54	25,80	65,29-101,78
			DAC	34,03	1,63	32,88-35,18
			DPG	151,48	31,23	129,39-173,56
			PG	11,96	0,54	11,58-12,34