

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**OCORRÊNCIA DE *Angiostrongylus cantonensis* (NEMATODA,
ANGIOSTRONGYLIDAE) EM *Achatina fulica* (MOLLUSCA, GASTROPODA) NA
BAIXADA SANTISTA.**



Laura Rocha Guerino

BOTUCATU, SP 2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**OCORRÊNCIA DE *Angiostrongylus cantonensis* (NEMATODA,
ANGIOSTRONGYLIDAE) EM *Achatina fulica* (MOLLUSCA, GASTROPODA) NA
BAIXADA SANTISTA.**

Laura Rocha Guerino

Orientador: Dr. Reinaldo José da Silva

Coorientadora: Dra. Iracy Lea Pecora

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (AC Zoologia) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, *Câmpus* de Botucatu/SP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Zoologia.

BOTUCATU, SP 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Guerino, Laura Rocha.

Ocorrência de *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Achatina fulica* (Mollusca, Gastropoda) na Baixada Santista. / Laura Rocha Guerino. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Reinaldo José da Silva

Coorientador: Iracy Lea Pecora

Capes: 21302006

1. Meningoencefalite. 2. Sistema nervoso central - Doenças. 3. Molusco. 4. Larva. 5. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Caracol gigante africano; Larvas L3; Meningoencefalite eosinofílica; Verme do pulmão do rato.

Ao meu esposo Aparecido Guerino que, durante esses longos anos de trabalho, soube se fazer presente em todos os momentos. Não existem palavras que possam expressar minha gratidão pelo tempo, paciência, carinho, amizade que você me direcionou. Dizer obrigada é pouco, porém a ele acrescento meu eterno carinho.

Aos meus filhos, Gabriela e Pedro, por fazerem parte da minha vida e dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Reinaldo José da Silva, pela oportunidade e confiança em mim depositada desde o início, e pela orientação, amizade sincera, incentivo e importante participação na minha formação científica.

À minha amiga-irmã e coorientadora, Professora Iracy Lea Pecora pela orientação, amizade, paciência, carinho, simplicidade, por estar sempre com um sorriso alegre e tranquilizador e pela cessão da foto da capa deste trabalho.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite para participar e contribuir para este trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou, especialmente Dra. Roberta Lima Caldeira e Dr. Omar dos Santos Carvalho pela ajuda, colaboração e disponibilidade.

Ao amigo Marcel Sabino Miranda pela amizade, conselhos e pela colaboração nas análises moleculares e análises estatísticas.

Ao auxiliar de campo Aparecido Guerino por ter me acompanhado em todas as coletas.

Ao Prof. Marcos Antonio de Oliveira por ter cedido o LABIMES (Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural) do *Câmpus* do Litoral Paulista para as análises moleculares.

Ao Carlos Alexandre Breyer pela paciência, orientações e ensinamentos nas técnicas em biologia molecular.

Às técnicas do laboratório do Centro de Pesquisa René Rachou Tatiana Maria Teodoro, Gisele Resende Espindola e Cryslaine Aguiar Silva pela ajuda, colaboração e disponibilidade.

Às técnicas do laboratório do CLP, Márcia Regina Coelho e Luciana B. Gomes da Silva, sempre prestativas na ajuda, minha gratidão pela dedicação e paciência.

Ao Instituto de Biologia, UNESP - Botucatu, pela oportunidade para a realização deste trabalho.

Ao *Câmpus* Experimental do Litoral Paulista (CLP), pela oportunidade para a realização da pesquisa deste trabalho.

À Secretaria da Educação do Estado de São Paulo, pela concessão da Bolsa de Mestrado, o que contribuiu em muito para a realização deste trabalho.

Às colegas do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (Lapas), onde sempre fui muito bem recebida.

Aos funcionários da biblioteca do *Câmpus* Experimental do Litoral Paulista (CLP), atenciosos em todos os momentos.

A todos aqueles que estiveram ao meu lado, seja apoiando ou incentivando, na realização deste trabalho.

As doenças infecciosas compõem-se de três variáveis, o hospedeiro, o patógeno e o ambiente. É um fluxo constante, capaz de mudar a cada passo por qualquer variação em um de seus componentes. Novas doenças aparecem, as antigas se alteram, e algumas desaparecem completamente.

Aidan Cockburn

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	ILUSTRAÇÕES	Pág
Figura 1.	Vermes de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> observados no pulmão de roedor infectado com o nematóide. Fêmeas possuem o intestino e o tubo reprodutor espiralados e os machos possuem ambos retilíneos (Fonte: Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS/Prof Dr Carlos Graeff-Teixeira).	03
Figura 2.	Distribuição mundial de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Fonte: Wang <i>et al.</i> , 2008) com a inclusão do Brasil.	04
Figura 3.	Ciclo de vida de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Fonte: Wang <i>et al.</i> , 2008).	05
Figura 4.	Pontos de coleta de <i>Achatina fulica</i> nos nove municípios da Baixada Santista.	14
Figura 5.	Biometria da concha de caracóis africanos, onde a é comprimento, b é o diâmetro ou largura, c é a altura, d é o diâmetro ou largura da abertura, e é altura da columela (Pacheco apud Caetano, 2005).	15
Figura 6.	Aparelho de Baermann utilizado para a coleta de larvas de nematóides.	16
Figura 7.	<i>Achatina fulica</i> encontrada em diferentes substratos: (a) pastoreando milho, (b) pastoreando fezes, Bairro Aviação, Praia Grande/SP; (c) sobre a vegetação, Jardim do Trevo, Praia Grande/SP; (d) dentro de encanamento, Vila Anhanguera, Mongaguá/SP; (e) pastoreando mamão, Ponta da Praia, Santos/SP; (f) pastoreando folhagem, Bairro Suarão, Itanhaém/SP; (g) sobre vegetação, Vila Tupi/Itanhaém/SP; (h) pastoreando papelão, Vila Erminda, Peruíbe/SP.	21
Figura 8.	Presença de <i>Achatina fulica</i> em restos de construção: (a) Bairro Aviação, Praia Grande/SP; (b) Parque das Bandeiras, São Vicente/SP; (c) Vila Couto, Cubatão/SP; (d) Jardim Casqueiro, Cubatão/SP; (e) Vila Lygia, Guarujá/SP e (f) Jardim Erminda, Peruíbe/SP;	22
Figura 9.	(a) <i>Bradybaena similares</i> ; (b) <i>Sarasinula marginata</i> ; (c) <i>Subulina octona</i> ; associados ao ambiente de (d) <i>Achatina fulica</i> , coletados em: a) Jardim Erminda, Peruíbe/SP, b) Bairro Samaritá, São Vicente/SP, c) Bairro Valongo, Santos/SP e d) Bairro Canto do Forte, Praia Grande/SP.	23

- Figura 10.** Visão geral dos locais de coleta no município de Cubatão, São Paulo, próximos à Mata Atlântica nos bairros: (a) Costa e Silva e (b) Parque São Luís. 23
- Figura 11.** Larvas L2 de *Angiostrongylus cantonensis* isoladas de *Achatina fulica*: (a) Vista geral de larva L2, Poro excretor (PE) e ponta da cauda com entalhe típico (PCT); (b) Detalhes da extremidade anterior e posterior mostrando a estrutura em forma de botão (EB), estrutura em forma de haste (EH) e esôfago (E). Escala 50 µm. 26
- Figura 12.** Larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* isolados de *Achatina fulica*. (a) Vista geral de larva L3 (Escala 50 µm.). (b) Detalhes da extremidade anterior mostrando a estrutura em forma de botão (EB), estrutura em forma de haste (EH) esôfago (E) e poro excretor (PE) (Escala 25 µm). (c) Detalhes da extremidade posterior mostrando o ânus (A) e ponta da cauda com entalhe típico (PCT) (Escala 25 µm). 26
- Figura 13.** Vetores da PCA, mostrando a influência que cada variável teve na distribuição dos dados. Legenda: L = Largura; CT = Comprimento total; CE = comprimento do esôfago; CC = Comprimento da cauda. 28
- Figura 14.** Análise da distribuição espacial da densidade larvas de nematóides em *Achatina fulica*. 28
- Figura 15.** Análise da distribuição espacial da densidade larvas de *Angiostrongylus cantonensis* em *Achatina fulica*. 29
- Figura 16.** Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (650pb *Angiostrongylus cantonensis*) obtidos pela digestão da região ITS2 do rDNA com a enzima Clal. Canaleta 1: Padrão de peso molecular phi x 174; Canaleta 2: larvas de *Angiostrongylus cantonensis* oriundas de Bertioga/SP; Canaletas 3, 9, 10: DNA não amplificou; Canaletas 4, 5: larvas de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de Mongaguá/SP; canaleta 6: amostra de *Angiostrongylus costaricensis* (Laboratório de Helmintoses Intestinais do Instituto René Rachou, FIOCRUZ); canaleta 7: amostra de *Angiostrongylus cantonensis* (Laboratório de Helmintoses Intestinais do Instituto René Rachou, FioCRUZ); Canaleta 8: larvas de *Angiostrongylus cantonensis* oriundas de Praia Grande/SP 32

Médias de larvas de *Angiostrongylus cantonensis* de jovens
Figura 17. adultos e adultos e comprimento da concha, letras iguais 33
significam semelhanças entre os tratamentos.

Número de adultos jovens e adultos infectados com larvas de
Figura 18. *Angiostrongylus cantonensis*, letras diferentes indicam 33
diferenças entre os tratamentos.

LISTA DE TABELAS

	Tabelas	Pág
Tabela 1.	Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de <i>Achatina fulica</i> coletados nos nove municípios da Baixada Santista.	24
Tabela 2.	Medidas (μm) de larvas L2 e L3 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> recuperadas de <i>Achatina fulica</i> infectadas naturalmente e características da cauda.	25
Tabela 3.	Resumo quantitativo de moluscos <i>Achatina fulica</i> desde os coletados até os positivos para <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , nos nove municípios da Baixada Santista.	30
Tabela 4.	Número de larvas de nematóides e de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em lotes de moluscos <i>Bradybaena similares</i> , <i>Subulina octona</i> e <i>Sarasinula marginata</i> nos municípios de Praia Grande/SP e Santos/ SP.	31
Tabela 5.	Comparação morfométrica (μm) de larvas L3 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> e características da cauda.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

*Cla*I: enzima de restrição.

DNA: deoxyribonucleic acid; ácido desoxirribonucleico.

dNTPs: deoxynucleotide triphosphate; desoxirribonucleotídeo trifosfato.

G: unidade da força centrípeta relativa.

ITS2: região espaçadora transcrita interna dois.

KCl: cloreto de potássio.

L1: larvas de primeiro estágio.

L2: larvas de segundo estágio.

L3: larvas de terceiro estágio.

MgCL₂: cloreto de magnésio.

mm: milímetro.

mM: milimolar.

NC1 (forward): “iniciador”, sequência de oligonucleotídeos complementar à região da fita molde.

NC2 (reverse): “iniciador”, sequência de oligonucleotídeos complementar à região da fita molde.

PCA: análise de componentes principais.

PCR: polymerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase.

PCR-RFLP: PCR associado a polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição.

pH: potencial Hidrogeniônico.

phi x 174: padrão de peso molecular.

rDNA: ácido desoxirribonucleico ribossomal; ribosomal deoxyribonucleic acid.

RFLP: restriction fragments length polymorphisms; polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição.

Taq: enzima DNA polimerase.

Tris-HCl: Tris ácido clorídrico.

µl: microlitro.

µg: micrograma.

Sumário

Resumo	
Abstract	
3. Introdução	3
3.1 <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	3
3.1.1 Distribuição	4
3.1.2 Ciclo de vida	4
3.2 Os hospedeiros definitivos	5
3.3 A doença	6
3.4 Os hospedeiros intermediários e paratênicos	8
3.5 <i>Achatina fulica</i>	9
3.6 Análises moleculares e morfológicas	12
4. Objetivos	13
4.1 Geral	13
4.2 Específicos	13
5. Material e Métodos	13
5.1 Procedência dos moluscos	13
5.2 Coleta e <i>Transporte</i>	14
5.3. Avaliação externa	15
5.4 Identificação dos moluscos	15
5.5 Verificação da presença de larvas L3 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em <i>Achatina fulica</i>	15
5.6 Verificação da presença de larvas L3 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em outras espécies de moluscos	16
5.7 Análise molecular	17
5.7.1 Extração de DNA	17
5.7.2 Multiplex-PCR	17
5.7.3 PCR – RFLP	18
5.8 Análise morfológica e morfométrica	18
5.9 Análise estatística	19
6. Resultados	19
7. Discussão	33
8. Conclusões	41
9. Referências bibliográficas	42

1. Resumo

Angiostrongylus cantonensis é o agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica, também chamado de “verme do pulmão do rato”. Mundialmente, a expansão desse nematóide está ligada à dispersão e colonização pelo caracol gigante africano (*Achatina fulica*). O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de larvas de *A. cantonensis* em moluscos *A. fulica* naturalmente infectados, nos nove municípios que compõem a Baixada Santista. Foram capturados 540 exemplares na área urbana dos municípios: São Vicente, Santos, Praia Grande, Cubatão, Mongaguá, Itanhaém, Peruíbe, Guarujá e Bertioga. A técnica utilizada para a obtenção de larvas foi a de Wallace & Rosen e sedimentação, por 3 h, pelo método de Baermann. Após a sedimentação, o material foi observado em microscópio estereoscópico de campo claro, para visualização das larvas que foram posteriormente congeladas a -70°C . O DNA foi extraído e submetido à PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição) direcionada para a região espaçadora transcrita interna dois (ITS2-rDNA) e clivada com a enzima *ClaI*. Para as análises morfológicas e morfométricas foram utilizadas 60 larvas, sendo 30 em estágio L2 e 30 em L3. No total, foram analisados 90 pontos (bairros), dos quais 73 (81,11%) apresentaram moluscos com larvas de nematóides. Dos 540 caracóis analisados, 204 (37,77%) apresentaram larvas de nematóides, sendo que 79 (38,72%) foram submetidos às análises moleculares; constatou-se a infecção por *A. cantonensis* em 63 (79,75%) moluscos. O número de larvas por molusco variou de 1 a 9.723 em exemplares que apresentavam 61,0 e 70,0 mm de comprimento de concha, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre o número de larvas de *A. cantonensis* e o comprimento das conchas dos indivíduos adultos jovens e adultos e nem entre as médias de larvas encontradas entre indivíduos adultos jovens e adultos. Foram encontradas diferenças significativas quando se comparou o número de indivíduos jovens adultos e adultos infectados com larvas de *A. cantonensis*. As L2 mediram em média 358,2 μm e 26,4 μm (comprimento e largura) e as L3 encontradas apresentaram média de 450 μm e 21,12 μm para comprimento e largura, respectivamente, medidas compatíveis com *A. cantonensis*. Foi observado que a cauda termina em ponta fina, que é típico da espécie. Todos os municípios da Baixada Santista apresentaram caracóis africanos naturalmente infectados com *A. cantonensis*.

Palavras-chave: Caracol gigante africano, verme do pulmão do rato, meningoencefalite eosinofílica, Baixada Santista, nematoide.

2. Abstract

Angiostrongylus cantonensis is the causative agent of eosinophilic meningoencephalitis, also called "rat lungworm". Worldwide, the expansion of this nematode is linked to the dispersal and colonization by giant African snail (*Achatina fulica*). The aim of this work was to verify the occurrence of larvae of *A. cantonensis* in mollusks *A. fulica* naturally infected in nine cities that compose the "Baixada Santista" region. About 540 specimens were collected in urban areas of the following cities: São Vicente, Santos, Praia Grande, Cubatão, Mongaguá, Itanhaém, Peruibe, Guarujá and Bertioga. The technique used for obtaining larvae was based on Wallace & Rosen and sedimentation for 3 h using the method of Baermann. After sedimentation, the material was observed under bright-field stereoscopic microscope for viewing larvae that were subsequently frozen at -70°C. DNA was extracted and submitted to PCR - RFLP (polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism) directed to the internal transcribed spacer region two (ITS2 - rDNA) and cleaved with *ClaI* enzyme. For morphological and morphometric analyses, 60 larvae were used, 30 in stage L2 and 30 in stage L3. Overall, 90 points (neighborhoods) were analyzed, of which 73 (81.11 %) showed mollusks with nematode larvae. Of the 540 snails examined, 204 (37.77 %) showed nematode larvae, and 79 (38.72 %) were submitted to molecular analyses, and infection by *A. cantonensis* was found in 63 (79.75 %) mollusks. The number of larvae per mollusk varied from 1 to 9723 in specimens showing 61.0 and 70.0 mm in shell length, respectively. No significant differences were observed between number of larvae of *A. cantonensis* and the shell length of young adults and adults, nor between the average number of larvae found between young adults and adults. Significant differences were found when comparing the number of young adult and adult individuals infected with larvae of *A. cantonensis*. L2 measured on average 358.2 µm and 26.4 µm (length and width) and L3 measured on average 450 µm and 21.12 µm for length and width, respectively, which are compatible with *A. cantonensis*. It was observed that the tail ends in a thin tip, which is typical of the specie. All cities that compose the "Baixada Santista" region had African snails naturally infected with *A. cantonensis*.

Keywords: Giant African snail, rat lungworm, eosinophilic meningoencephalitis, "Baixada Santista" region, nematode.

3. Introdução

3.1 *Angiostrongylus cantonensis*

Dezenove espécies de Metastrongylidae do gênero *Angiostrongylus* (Kamenky, 1905) são conhecidas no mundo e podem ser infectantes para pequenos mamíferos (Bhaibulay, 1991). Duas espécies podem infectar o homem: *Angiostrongylus costaricensis* (Morera e Céspedes, 1971), causador da angiostrongilíase abdominal (Morera, 1973), e *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), agente etiológico da meningite (ou meningoencefalite) eosinofílica (Alicata, 1962), também chamado de “verme do pulmão do rato”. Nomura & Lin (1945) descreveram, no homem, o primeiro caso de meningite eosinofílica humana causada por *A. cantonensis*. O segundo caso de infecção por este parasita foi descrito no Havaí em 1961 (Rosen *et al.*, 1962). O indivíduo adulto macho mede de 20 a 25 mm x 0,32 a 0,42 mm e a fêmea mede de 22 a 34 mm x 0,34 a 0,56 mm (Wang *et al.*, 2008) (Figura 1).



Figura 1. Vermes de *Angiostrongylus cantonensis* observados no pulmão de roedor infectado com o nematóide. Fêmeas possuem o intestino e o tubo reprodutor espiralados e os machos possuem ambos retilíneos (Fonte: Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS/Prof Dr Carlos Graeff-Teixeira).

3.1.1 Distribuição

Angiostrongylus cantonensis se dispersou do leste Asiático para outras regiões em dois hospedeiros importantes, ratos (hospedeiros definitivos) e *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) (um dos hospedeiros intermediários), especialmente durante a Segunda Guerra Mundial (Kliks & Palumbo, 1992). *Angiostrongylus cantonensis* já foi observado no Sudoeste da Ásia, Pacífico Sul, África, Índia, Caribe, Austrália (Prociv *et al.*, 2000), América do Norte (Pien & Pien, 1999), Jamaica (Lindo *et al.*, 2002), Haiti (Racurt *et al.*, 2003), China (Lai *et al.*, 2007) e Equador (Pincay *et al.*, 2009). No Brasil, já foi reportado em nove Estados: Espírito Santo, São Paulo (Caldeira *et al.*, 2007), Pernambuco (Thiengo *et al.*, 2010), Rio de Janeiro e Santa Catarina (Maldonato *et al.*, 2010), Bahia e Paraná (Carvalho *et al.*, 2012), Pará (Moreira *et al.*, 2013), Rio Grande do Sul (Cognato *et al.*, 2013), confirmando as previsões de introdução deste parasita na América do Sul (Figura 2).

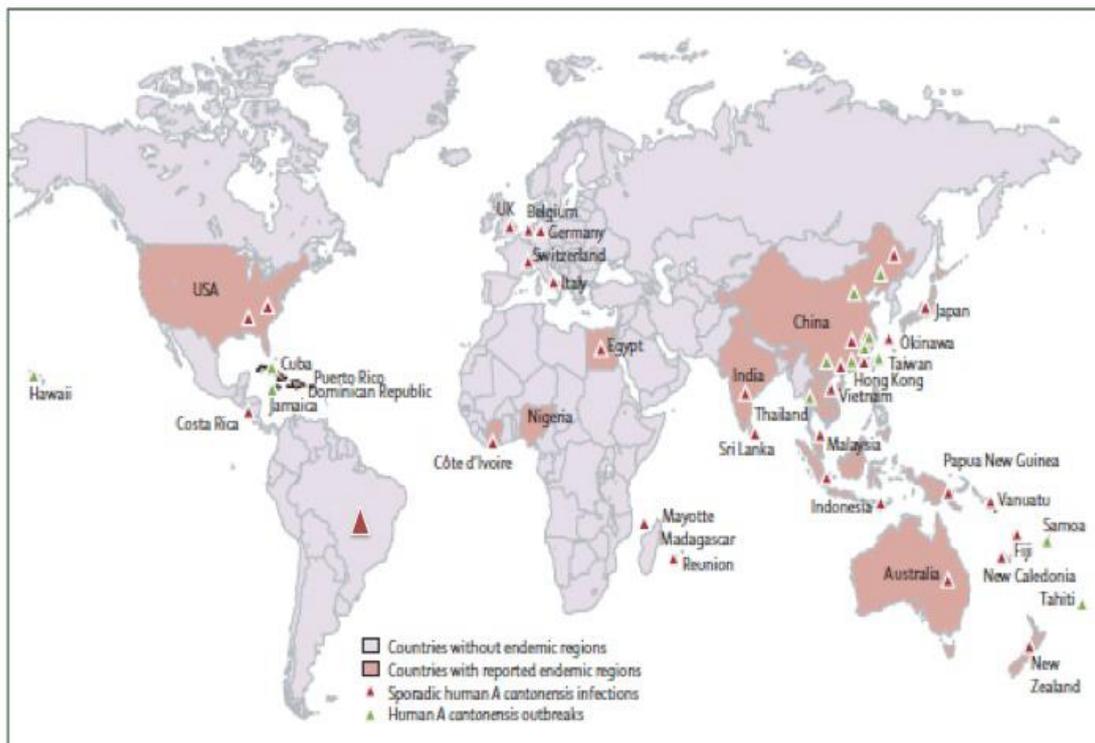


Figura 2. Distribuição mundial de *Angiostrongylus cantonensis* (Fonte: Wang *et al.*, 2008, modificado com a inclusão do Brasil).

3.1.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida (Figura 3) desse parasita envolve dois hospedeiros, um roedor (hospedeiro definitivo) e um molusco (hospedeiro intermediário). Os

vermes adultos vivem nos vasos sanguíneos dos pulmões dos roedores e lá depositam seus ovos; estes se alojam nos ramos terminais das artérias pulmonares onde eclodem após seis dias, liberando larvas de primeiro estágio (L1) (Weinstein *et al.*, 1963). Estas larvas L1 migram através do espaço alveolar para a traqueia, faringe, esôfago e alcançam o intestino, sendo liberadas junto com as fezes do hospedeiro vertebrado. As larvas L1 nos hospedeiros intermediários sofrem duas mudas, transformando-se em larvas L2 e larvas L3, que são as formas infectantes para o hospedeiro definitivo (Wen, 1977). As larvas L3 podem permanecer presas ao tecido fibromuscular ou ser liberadas junto com o muco secretado pelos moluscos.

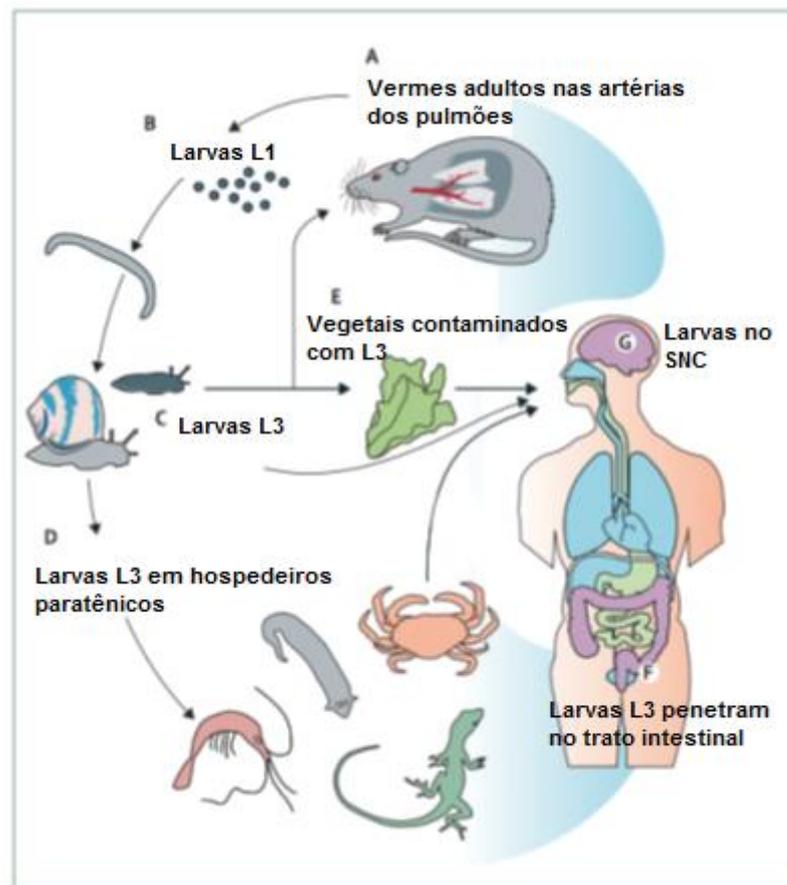


Figura 3. Ciclo de vida de *Angiostrongylus cantonensis* (Fonte: Wang *et al.*, 2008).

3.2 Os hospedeiros definitivos

Os hospedeiros definitivos infectam-se após ingerir as larvas L3. Estas larvas migram do intestino para o sistema nervoso central, onde se tornam adultos jovens após dois estágios de desenvolvimento, que ocorrem em duas ou três semanas. Os adultos migram para o espaço subaracnoide, entram no

sistema venoso e chegam às artérias pulmonares onde atingem a maturidade. As larvas L1 são detectadas nas fezes dos roedores de 40 a 60 dias após a infecção.

Em Porto Rico, roedores da espécie *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) foram encontrados abrigando vermes adultos de *A. cantonensis* (Andersen *et al.*, 1986). O mesmo relato foi encontrado em áreas do porto e aeroporto de Kaohsiung em Taiwan (Yen *et al.*, 1996), fato preocupante em virtude da abundância de roedores nas áreas de carga e possível transporte dos mesmos para diversas regiões. Lindo *et al.*, (2002), em suas pesquisas com *R. norvegicus* e *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) capturados em várias regiões da Jamaica após um surto de meningite eosinofílica, constataram que 22% dos roedores estavam infectados com *A. cantonensis*.

No Brasil, os primeiros roedores (*R. norvegicus*) naturalmente infectados com *A. cantonensis* foram observados no Estado do Rio de Janeiro, município de São Gonçalo, onde foram capturados 27 exemplares, que apresentaram taxa de infecção de 74% (19/27), sendo a segunda maior entre as 14 infecções mais severas relatadas em regiões endêmicas (Simões *et al.*, 2011). Posteriormente outros roedores foram encontrados infectados naturalmente com o *A. cantonensis*: no Estado do Pará em *R. norvegicus* e *R. rattus* (Moreira *et al.*, 2013), e no Estado do Rio Grande do Sul em *R. norvegicus* (Cognato *et al.*, 2013).

3.3 A doença

O homem, sendo um hospedeiro acidental, adquire a parasitose ao ingerir moluscos infectados ou alimentos contaminados com larvas L3 presentes no muco secretado por moluscos terrestres - seus hospedeiros intermediários - ou no contato com os hospedeiros paratênicos. Após a ingestão das larvas L3, estas penetram pelo trato intestinal, vasos sanguíneos, e são levadas para as meninges, onde usualmente morrem (Chotmongkol *et al.*, 2006) e os produtos químicos liberados pela sua decomposição causam a resposta eosinofílica no líquido cefalorraquidiano (Alicata, 1965). A meningite ou meningoencefalite eosinofílica é uma doença grave, pois a inflamação ocorre nas meninges e envolve também o tecido cerebral (Hughes *et al.*, 2003).

As larvas L3 podem estar presentes no cérebro e no fluido cérebro-espinhal (CSF) em uma ou três semanas após a infecção (Wilkins *et al.*, 2013). A patogenia depende diretamente dos danos causados pela movimentação das larvas e da reação inflamatória granulomatosa da pessoa infectada. Em cortes histológicos observam-se em torno dos vermes, células inflamatórias (histiócitos, neutrófilos e eosinófilos), congestão vascular, hemorragia subdural e subaracnoide, necrose focal e hemorragia cerebral (Cross, 1987; Alto, 2001).

A incubação desta doença varia de um dia a meses, dependendo do número de larvas envolvidas (Alto, 2001; Panackel *et al.*, 2006). As manifestações clínicas podem incluir dores de cabeça, rigidez na nuca, febre, vômito, náuseas, irritabilidade, retenção ou incontinência anal e urinária, prurido, dor abdominal, distúrbios visuais e lesões oculares permanentes (Alicata, 1965; Punyagupta *et al.*, 1975; Kuberski & Wallace, 1979; Koo *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 2008).

O histórico de deslocamentos por áreas endêmicas, diagnóstico sorológico associado a manifestações clínicas compatíveis com meningite e presença de eosinofilia no (CSF), sugerem o quadro de meningoencefalite eosinofílica (Panackel *et al.*, 2006). Durante a infecção, a quantidade de leucócitos no CSF é frequentemente de 150 e 200 células/ μ l. Pleocitose eosinofílica excede 10% em mais de 90% dos pacientes (Kuberski & Wallace, 1979). Eosinofilia é encontrada no sangue periférico em aproximadamente 2/3 dos pacientes (Pien & Pien, 1999). As larvas raramente são encontradas no CSF (Punyagupta *et al.*, 1975; Kuberski & Wallace, 1979) 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 & Yong, 2009; Eamsobhana, 2013). O diagnóstico molecular também tem sido utilizado para detecção do DNA de *A. cantonensis* no (CSF) de pacientes (Lima *et al.*, 2009, Wilkins *et al.*, 2013).

O uso de anti-helmínticos não se mostrou eficaz até o momento. O alívio dos sintomas foi relatado com o uso de analgésicos, corticoides e remoção do CSF em frequentes intervalos de tempo (Yii, 1976; Pien & Pien, 1999).

A meningite eosinofílica é considerada uma zoonose, que tem como hospedeiros definitivos naturais roedores silvestres e roedores sinantrópicos como, *R. norvegicus* e *R. rattus* (Namue & Wongsawad, 1997). Os ratos são

necessários para o estabelecimento dos parasitas no local. Quando *A. cantonensis* é identificado no rato, o parasita passa a ser considerado endêmico na região (Wang *et al.*, 2008).

No Brasil, foram reportados 10 casos de meningite eosinofílica: os três primeiros casos nos municípios de Cariacica e Vila Velha no Espírito do Santo (Caldeira *et al.*, 2007), subseqüentemente dois casos nos municípios de Olinda e Escada em Pernambuco (Thiengo *et al.*, 2010), quatro casos na mesma família em Mongaguá, São Paulo (Ciaravolo *et al.*, 2010) e, recentemente, um caso no município de São Paulo, São Paulo (Espírito-Santo *et al.*, 2013).

3.4 Os hospedeiros intermediários e paratênicos

Uma variedade de moluscos terrestres e de água doce foi observada infectada naturalmente com *A. cantonensis*. Os hospedeiros intermediários naturais são algumas espécies de moluscos como *A. fulica*, *Sarasinula marginata* (Semper, 1885), *Subulina octona* (Bruguière, 1792), *Bradybaena similares* (Férussac, 1821), *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822), *Pomacea lineata* (Spix, 1827), *Deroceras leave* (Müller, 1774), (Caldeira *et al.*, 2007; Thiengo *et al.*, 2010; Maldonato *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012).

Na China, *A. fulica* e *P. canaliculata*, ambos não nativos, são os principais hospedeiros intermediários do *A. cantonensis* e a transmissão da meningite eosinofílica está diretamente relacionada às duas espécies. Recentemente, surtos graves de meningite eosinofílica foram relatados, e, na maioria dos casos, diretamente relacionados ao consumo de *P. canaliculata* mal cozida (Lv *et al.*, 2009a; Lv *et al.*, 2009b; Yang *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2013). Entre 1997 e 2006, sete surtos de angiostrongilíase foram reportados na China, onde seis foram atribuídos a *P. canaliculata* (Lv *et al.*, 2008).

Como hospedeiros paratênicos são relatados camarões, rãs, peixes, planárias, sapos (Rachford, 1975; Ash, 1976; Prociv *et al.*, 2000; Lv *et al.*, 2008), caranguejos e lagartos (Panackel *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Quando contaminados com hospedeiros paratênicos, vegetais e sucos também tem sido identificados como fonte de infecção (Slom *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2004).

O molusco *A. fulica* é considerado o mais importante hospedeiro intermediário de *A. cantonensis* (Alicata, 1965; Morera, 1973; Kliks & Palumbo,

1992; Wang *et al.*, 2008; Tokiwa *et al.*, 2013), devido a sua susceptibilidade ao parasita, bem como a liberação de larvas do nematóide que é superior a dos demais moluscos (Wallace & Rosen, 1969b), muito embora em seus estudos Neuhauss *et al.*, (2007) concluíram que a presença do molusco, mesmo que em grande quantidade, não oferece risco sanitário ao homem, principalmente devido à baixa produtividade de larvas obtidas nos experimentos laboratoriais.

A maioria dos casos de meningite eosinofílica em Taiwan tem sido reportada em crianças expostas a *A. fulica* (Yii, 1976; Tsai *et al.*, 2001).

Carvalho *et al.* (2012) reportaram a presença de *S. marginata*, *S. octona* e *B. similaris* e *A. fulica* infectados naturalmente com *A. cantonensis* em 11 (36,6%) dos 30 portos no Brasil.

3.5 *Achatina fulica*

O molusco *A. fulica* é uma espécie tropical, originária da África, cuja diferenciação provavelmente se deu entre as regiões Oeste e Central deste continente, às margens das florestas (Raut & Barker, 2002). Segundo Fischer & Colley (2005), provavelmente a necessidade de estratégias adaptativas nesse tipo de ambiente instável pode ter favorecido o hábito generalista deste animal.

Achatina fulica é um gastrópode pulmonado terrestre conhecido como caracol gigante africano, pois, adultos dessa espécie atingem tamanho avantajado, podendo ser encontrados com conchas de 15 a 20 cm de altura e 10 a 12 cm de largura, pesando em média 200 g. São hermafroditas, mas dependem da fecundação cruzada; atingem a maturidade sexual com cerca de 100 a 120 dias executando entre 3 e 5 posturas anuais, em média.

No Estado de São Paulo, os valores máximos encontrados foram ao redor de 100 g de massa e 10 cm de comprimento de concha (Paiva, 2004). Sua presença tem sido relatada em diversas regiões da África, Sudeste Asiático, Ilhas do Pacífico, Austrália, Japão, Madagascar e, mais recentemente, no continente americano (Vasconcelos & Pile, 2001). Esses moluscos são típicos de regiões tropicais e subtropicais, graças a sua capacidade de adaptação nestes climas, o que torna o Brasil um país com grande potencialidade para a heliocultura tropical extensiva.

A introdução de *A. fulica* no Brasil se deu visando ao cultivo e comercialização de “escargots”, a partir de 1988 no Estado do Paraná, por criadores que consideravam a produção destes animais uma alternativa economicamente viável, pois possuem rápido e intenso processo reprodutivo (Teles *et al.*, 1997). Assim, as matrizes foram propagadas durante os cursos de helicicultura. No entanto, os consumidores não apreciaram o sabor, a textura e o aspecto da carne deste caracol. A criação desses animais tornou-se inviável aos proprietários que, devido à sua rápida proliferação, passaram a ter gastos excessivos e, aliados ao desconhecimento da biologia dos moluscos, jogaram suas criações na natureza de forma inconsequente (Paiva, 2004).

Esses animais são extremamente resistentes a longos períodos de seca, suportando grandes variações climáticas, alimentando-se de diversas plantas e, considerando-se a sua alta adaptabilidade ao ambiente, não encontraram dificuldade em território brasileiro para crescerem e multiplicarem-se intensamente.

O primeiro registro brasileiro de *A. fulica* fora do cativeiro ocorreu no município de Itariri no Estado de São Paulo e, após quatro anos, foi registrado no Estado do Rio de Janeiro (Vasconcelos & Pile, 2001). Atualmente se encontra distribuído por 25 Estados e o Distrito Federal, englobando diferentes ecossistemas em todo o Brasil (Teles *et al.*, 1997; Vasconcelos & Pile, 2001; Oliveira *et al.*, 2013).

Esses moluscos foram classificados entre as cem piores espécies exóticas invasoras de ocorrência mundial (Alowe *et al.*, 2004). Eles sobrevivem tanto em meios naturais como antrópicos: florestas, capoeiras, bordas de florestas, caatingas, brejos, outras áreas de vegetação nativa, áreas de cultura como hortas e pomares, sendo também encontrados em plantações abandonadas, terrenos baldios urbanos, quintais e jardins (Vasconcelos & Pile, 2001). As espécies exóticas que se tornam invasoras em zonas antrópicas ampliam facilmente sua área de ocorrência. Raut & Barker (2002) relataram em seus trabalhos a versatilidade de *A. fulica* em expandir-se rapidamente para outras regiões. O ambiente antrópico oferece mais substratos, favorecendo a instalação de mais indivíduos, como também amenizam as condições ambientais extremas, aumentando a taxa de sobrevivência; desse modo, as infestações de *A.*

fulica vêm sendo detectadas primeiramente em ambientes alterados e esta preferência tem sido registrada por vários autores em diferentes países (Lake & O' Dowd, 1991; Kliks & Palombo, 1992; Thiengo *et al.*, 2007).

A presença de *A. fulica* é preocupante devido aos riscos que pode causar à saúde humana, aos prejuízos econômicos e aos danos ecológicos que se sobressaem aos demais. Na agricultura, pode destruir plantações de diversas espécies vegetais, causando danos econômicos e muitas vezes inviabilizando plantações de subsistência de famílias de baixa renda. Sabe-se que esses moluscos têm preferência por culturas de frutas e legumes, devorando brotos e talos novos, mas incluindo em sua dieta outras partes do vegetal como folhas e ramos.

Os primeiros registros brasileiros de *A. fulica* infectadas naturalmente com *A. cantonensis* ocorreram nos Estados do Espírito Santo (municípios de Cariacica e Vila Velha) e no Estado de São Paulo, município de São Vicente (Caldeira *et al.*, 2007). Nesse município paulista também foram detectados 20 casos de meningite que, segundo registros da Vigilância Epidemiológica (fonte: Secretaria de Saúde de São Vicente/SP) foram descartados agentes etiológicos como vírus, bactérias e fungos. Esses casos podem indicar infecção por *A. cantonensis*. Posteriormente este nematódeo foi registrado em Pernambuco (Thiengo *et al.*, 2010), Rio de Janeiro e Santa Catarina (Maldonato *et al.*, 2010), Bahia e Paraná (Carvalho *et al.*, 2012) e Pará (Moreira *et al.*, 2013).

Larvas de *Aelurostrongylus abstrusus* – Nematoda: Metastrongylidae - (Railliet, 1898), parasita de pulmão de cães e gatos domésticos, podem ser encontradas em *A. fulica* que, assim como outros moluscos, atua como hospedeiro intermediário. Larvas do nematóide *Strongyluris* sp (Travassos, 1823), também foram observadas na cavidade paleal desses moluscos, evidenciando a importância veterinária destes na transmissão desses nematóides para cães e gatos (Thiengo *et al.*, 2008; Maldonato *et al.*, 2010).

A invasão ambiental por essa espécie de molusco é preocupante uma vez que ela se desenvolve sem controle no território brasileiro e acaba competindo com outros moluscos da fauna nativa, podendo causar desequilíbrio trófico e perda de diversidade (Raut & Barker, 2002). Diante disso, o Estado de São Paulo proibiu desde 2004 a criação e a comercialização destes animais para

fins de consumo, permitindo apenas a pesquisa (Lei Estadual 11756, de 1º de julho de 2004). Essa lei também autoriza a implementação de campanhas para controle, coleta e destruição de indivíduos dessa espécie.

A população e as autoridades devem trabalhar em conjunto, a fim de erradicar esta espécie do território brasileiro, como determina a Lei Estadual 11756, de 1º de julho de 2004, para o Estado de São Paulo. Essa tarefa é difícil e deve ser constante tendo em vista o hábito desses moluscos de oviporem dentro da terra.

Pelas razões apresentadas, a invasão ambiental de *A. fulica* associada à ausência de predadores naturais e a altas taxas de reprodução fez com que a espécie se instalasse em todas as regiões brasileiras, sendo necessário o monitoramento dos novos focos no país, no sentido de prevenir os prejuízos à agricultura e riscos à saúde pública e ambiental.

3.6 Análises moleculares e morfológicas

Segundo McKeand (1998) muitas espécies de nematóides não podem ser identificadas com certeza utilizando-se apenas as técnicas morfológicas e morfométricas tradicionais.

A identificação morfológica de *A. cantonensis* em hospedeiros tem duas desvantagens: primeiro, consome muitas horas de trabalho e requer parasitologistas altamente treinados com habilidades para reconhecer o parasita; segundo: a identificação em nível de espécie só pode ser feito com vermes adultos machos que estejam com a parte posterior intacta. Estágios larvais podem apresentar características que permitam a identificação em nível de família ou gênero, dependendo do estágio e técnica de isolamento (Qvarnstrom *et al.*, 2013).

A identificação específica de larvas e vermes adultos de gênero *Angiostrongylus* com base nos caracteres morfológicos são inviáveis devido a descrições vagas e caracteres similares no tamanho e forma do corpo das espécies (Ubelaker, 1986).

A técnica de PCR-RFLP, que é baseada na amplificação de qualquer região do DNA e subsequente digestão com enzimas de restrição, tem sido fundamental, principalmente nos casos de conhecimentos genômicos escassos

do organismo como é o caso dos angiostrongilídeos. Além disso, a região espaçadora transcrita interna dois (ITS2) vem sendo utilizada para identificar espécies ou cepas, sendo um bom marcador em estudos de genética de população (Blouin *et al.*, 1998; Caldeira *et al.*, 2003; Qvarnstrom *et al.*, 2013).

Caldeira *et al.* (2003) padronizaram a técnica amplificando pela PCR a região ITS2 do rDNA (Gasser *et al.*, 1993) e clivando esta região com seis endonucleases diferentes (*Rsal*, *HapII*, *AluI*, *HaeIII*, *DdeI* e *Cla I*). Dentre elas, a enzima *Cla I* foi a que forneceu perfil mais claro e de fácil distinção das espécies *A. costaricensis*, *A. cantonensis* e *Angiostrongylus vasorum*, confirmando ser uma técnica eficiente na separação de helmintos.

4. Objetivos

4.1 Geral

- Verificar a ocorrência de *A. fulica* infectada naturalmente com *A. cantonensis* nos nove municípios da Baixada Santista, em ambiente urbano.

4.2 Específicos

- Recuperar larvas de nematóides obtidas de *A. fulica* infectadas naturalmente.
- Identificar, por meio de análises moleculares, a presença de larvas de *A. cantonensis*.
- Realizar o estudo morfológico e morfométrico das larvas de *A. cantonensis* obtidas de *A. fulica*.
- Caracterizar as áreas de maior incidência de *A. cantonensis* na Baixada Santista.

5. Material e Métodos

5.1 Procedência dos moluscos

As coletas dos exemplares de *A. fulica* foram realizadas na Baixada Santista de janeiro a julho de 2012. A escolha dos pontos foi feita de forma

aleatória, respeitando-se uma distância adequada entre um local e outro, tendo em vista a grande variação das áreas dos municípios e a disponibilidade de terrenos baldios nos bairros. Todos os 90 pontos foram caracterizados quanto às condições sanitárias e georeferenciados (Apêndice C).

Os exemplares utilizados nos experimentos foram capturados na área urbana dos nove municípios: São Vicente, Santos, Praia Grande, Cubatão, Mongaguá, Itanhaém, Peruíbe, Guarujá e Bertioga, dando-se preferência para os moluscos adultos jovens e adultos (Noda *et al.*, 1987; Sithihaworn *et al.*, 1991).

5.2. Coleta e Transporte

Foram coletados seis moluscos em dez pontos distintos de cada município acima relacionado, nos períodos matutino e noturno (Figura 4).

Os locais de coleta também foram vistoriados em relação à presença de outras espécies de moluscos e os mesmos também foram coletados.

As coletas foram feitas manualmente com uso de luvas e os moluscos acondicionados em recipientes plásticos.

Durante as coletas foram realizadas observações dos locais onde foram encontrados os moluscos, principalmente sobre suas condições sanitárias; essas informações foram anotadas em uma ficha específica.

Os exemplares foram transportados para o *Câmpus* Experimental do Litoral Paulista – UNESP.

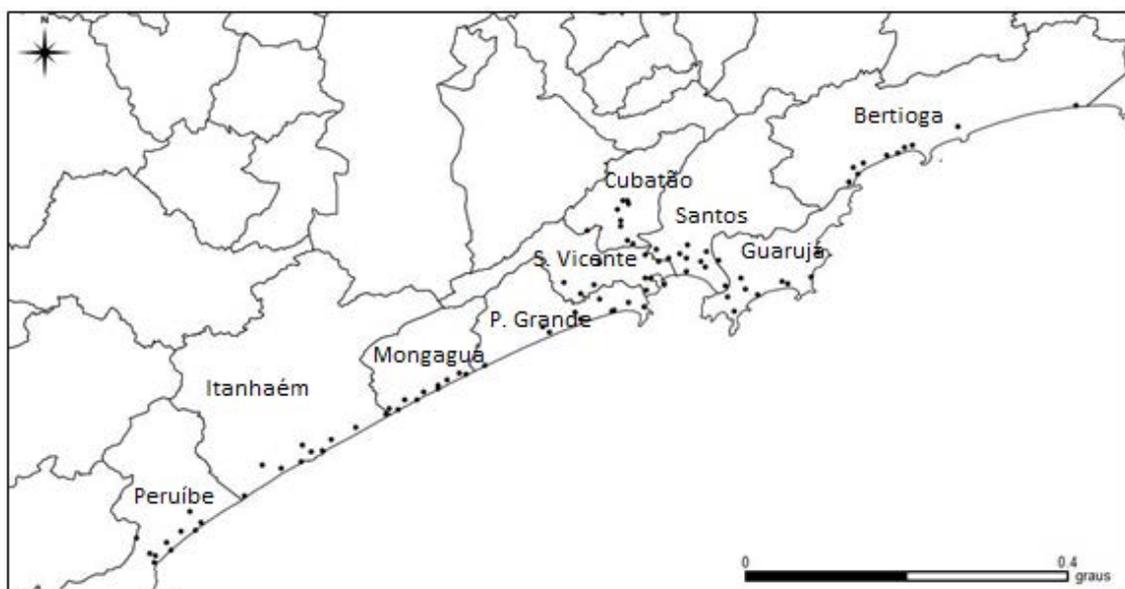


Figura 4. Pontos de coleta de *Achatina fulica* nos nove municípios da Baixada Santista.

5.3 Avaliação externa

Cada molusco foi lavado em água corrente, e medido com auxílio de paquímetro.

Os moluscos coletados foram mensurados conforme indica a Figura 5 e classificados em dois tamanhos: adultos jovens (40 – 70 mm) e adultos (> 70 mm) (Simião & Fischer, 2004).

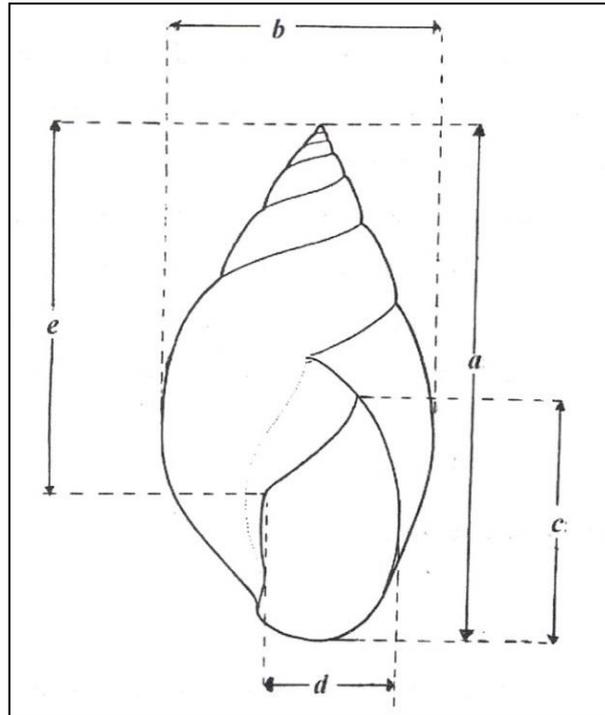


Figura 5. Biometria da concha de caracóis africanos, onde **a** é comprimento, **b** é o diâmetro ou largura, **c** é a altura, **d** é o diâmetro ou largura da abertura, **e** é altura da columela (Pacheco apud Caetano, 2005).

5.4 Identificação dos moluscos

Os moluscos *A. fulica*, *S. octona*, *B. similares* foram identificados segundo Simone (2006), e *S. marginata* pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo L. Simone do Museu de Zoologia da USP.

5.5 Verificação da presença de larvas de *A. cantonensis* em *A. fulica*

A técnica utilizada para a obtenção de larvas foi a de Wallace & Rosen (1969a). Os moluscos foram sacrificados individualmente, quebrando-se suas conchas e sua região cefalopodal fragmentada (aproximadamente 0,3 cm), os quais foram transferidos para tubos de Falcon, contendo aproximadamente 20 ml de solução digestiva (2,5 g de pepsina, 7 ml de HCl + 993 ml de água destilada),

adicionados de 20 ml de água a 37 °C e mantidos nessa temperatura em banho-maria, durante 2 h. O material digerido foi então transferido para o funil de Baermann, completando o seu volume com água a 37 °C, até cobrir o material e na presença de lâmpada incandescente de 60 watts (Figura 6). A sedimentação ocorreu em aproximadamente 3 h. Após esse período, o líquido foi aparado em tubos de Falcon (45 ml) e o sedimento foi examinado no microscópio estereoscópico para a localização de larvas móveis. As larvas encontradas foram contadas, coletadas sendo uma parte acondicionada em tubos *ependorf* de 1,5 ml e congeladas a – 70 ° C, para posterior análise molecular; outra parte foi fixada em álcool 70% para identificação morfológica e morfométrica. O número total de larvas foi utilizado para determinar a relação com o comprimento do molusco.

5.6 Verificação da presença de larvas de *A. cantonensis* em outras espécies de moluscos.

Os moluscos *S. octona* e *B. similares* foram coletados em dois pontos e sacrificados em grupos de cinco, formando os lotes que foram acondicionados no aparelho de Baermann, enquanto que os dois exemplares de *S. marginata* - coletadas em um único ponto – foram sacrificados juntos e formando um único lote no referido aparelho.



Figura 6. Aparelho de Baermann utilizado para a coleta de larvas de nematóides.

5.7 Análise molecular

5.7.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído com auxílio do “Kit Wizard” (Promega) a partir das larvas obtidas do molusco. Inicialmente, foram adicionados no tubo contendo as larvas 200 µl de solução de lise nuclear e 1 µl de proteinase K (20 µg/µl), que foram colocados no banho-maria a 37 °C, por no mínimo 10 h. Posteriormente, foram adicionados 80 µl de solução de precipitação proteica, a suspensão foi agitada vigorosamente com auxílio do vortex por 20 a 30 s e, em seguida centrifugada a 10.000 G por 3 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo ecentrifugado a 10.000 G por 6 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspendido com 500 µl de etanol gelado 100 % absoluto, juntamente com 10 µl de solução acetato de sódio 3M pH 5,2. Essa mistura foi incubada por 2 h a -70 °C e, em seguida, centrifugada por 10 min; posteriormente, foi desprezado o sobrenadante por inversão. Após este período o DNA foi lavado com 500 µl de etanol 70% e centrifugado a 10.000 G por 10 min. O sobrenadante foi descartado por inversão e os tubos foram deixados abertos em banho-maria a 37 °C até o etanol evaporar e, em seguida, o “pellet” foi ressuspendido com 25 µl de solução de reidratação por 30 min a 37 °C no banho-maria e armazenado a -20 °C.

5.7.2 Multiplex-PCR

A amplificação da região espaçadora transcrita do DNA ribossomal (ITS2-rDNA) foi realizada utilizando o iniciadores NC1 (forward; 5' – ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT–3') e NC2 (reverse; 5' – TTAGTTTCTTTTCTCCGCT–3') (Gasser *et al.*, 1993).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com um volume total de 10 µl, consistiu de 5,2 µl de água, 1,0 µl dNTPs, 1,0 µl tampão da Taq (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL, pH 8,5), 0,3 µl MgCl₂, 0,1 µl Taq, 0,7 µl de cada iniciador e 1,0 µl DNA diluído. A reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial foi feita por 3 min a 94 °C, seguida de 39 ciclos: anelamento a 58 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 90 s, e desnaturação a 94 °C por 50 s e uma extensão final a 72 °C por 10 min (Caldeira *et al.*, 2003).

Todos os experimentos foram acrescidos de um controle negativo, sem adição de DNA e armazenados a -20 °C.

Três microlitros do produto de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados pela prata para observação do perfil dos produtos de PCR.

5.7.3 PCR – RFLP

Os produtos de PCR foram diluídos em água, divididos em alíquotas de 10 µl e então digeridos separadamente. A reação de digestão com volume total de 11,3 µl consistiu de 1 µl do tampão da enzima, 0,3 µl da enzima de restrição *ClaI* (Caldeira *et al.*, 2003) e 10 µl do produto amplificado e diluído. A digestão foi realizada a 37 °C por 3 h e 30 min e depois, a 80 °C por 20 min. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados pela prata para observação dos perfis de restrição obtidos.

Para comparação com outros nematóides foram utilizados DNA de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* do acervo do Laboratório de Helmintoses Intestinais do Instituto René Rachou, Fiocruz, de Belo Horizonte-MG.

5.8 Análise morfológica e morfométrica

Para a análise morfológica e morfométrica foram utilizadas 60 larvas, sendo 30 em estágio L2 e 30 em L3, que foram fixadas em álcool 70%, acondicionadas em tubos *ependorf* de 1,5 ml e rotulados para posterior identificação. Posteriormente, as larvas foram clarificadas com lactofenol de Amann e analisadas em um sistema computadorizado de análise de imagens (Leica Application Suite Software LAS V 3.8 e microscópio DMB 5000 Leica®), com registro dos seguintes parâmetros morfométricos determinados por Ash (1970):

- 1- Comprimento total do corpo: linha média do corpo da larva entre as extremidades anterior e posterior;
- 2- Largura máxima: largura na altura da região de junção esôfago/intestino;
- 3- Comprimento do esôfago: linha média traçada da junção esôfago/intestino até a extremidade anterior;

- 4- Distância do poro excretor: linha externa traçada do poro excretor até a extremidade anterior;
- 5- Comprimento da cauda: linha externa traçada a partir do poro anal até a extremidade posterior;
- 6- Tipos de cauda: em ponta fina, digitiforme, arredondada e ponta fina com proeminências serrilhadas;

5.9 Análise estatística

Os dados foram avaliados para normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de Cochran para homogeneidade de variâncias. Quando os dados não eram normais ou eram heterocedásticos, eles eram transformados usando log.

A relação entre o comprimento da concha e o número de larvas encontradas foi avaliada por uma análise de regressão linear simples. O número de larvas encontradas em indivíduos jovens adultos e indivíduos adultos foram comparados pelo teste t.

O número de indivíduos infectados com *A. cantonensis* de jovens adultos e adultos foi analisado pelo teste Qui-quadrado.

Para os dados morfométricos, empregou-se análise de componentes principais (PCA), sendo utilizadas as seguintes variáveis: comprimento total, comprimento do esôfago, comprimento da cauda e largura total, utilizando o software MVSP 3.13a (Kovach Computing Service).

Com o número médio de larvas em cada ponto coletado, utilizou-se a interpolação por inverso da distância à potência, para verificar a distribuição espacial das larvas na Baixada Santista, usando o programa Quantum GIS (Quantum GIS Development Team, 2011).

6. Resultados

As coletas realizadas durante ou próximas a períodos de chuva foram mais bem sucedidas, pois o número de indivíduos encontrados foi superior àquele verificado nos dias mais secos.

Os registros dos locais foram realizados durante as coletas onde os moluscos foram encontrados, principalmente quanto à influência da atividade

antrópica. *Achatina fulica* foi detectada principalmente em ambientes alterados, em locais com muita disponibilidade de alimento e refúgio, como folhas, lixo urbano, restos de materiais de construção, embaixo de madeiras velhas e úmidas, jardins e plantações (Figura 7) e. Durante as coletas foi observado um grande número de indivíduos em torno de pedras e restos de materiais de construção (Figura 8) e outras espécies de moluscos associados ao mesmo ambiente, como *B. similares*, *S. octona* e *S. marginata* (Figura 9); desses também foram obtidas larvas de nematóides que foram submetidas à caracterização molecular e todas apresentaram perfis compatíveis com *A. cantonensis* (Tabela 4).

Com relação às condições sanitárias dos locais de coleta é necessário ressaltar que a maioria se encontrava imprópria (Apêndice C).



Figura 7. *Achatina fulica* encontrada em diferentes substratos: (a) pastoreando milho, (b) pastoreando fezes, Bairro Aviação, Praia Grande/SP; (c) sobre a vegetação, Jardim do Trevo, Praia Grande/SP; (d) dentro de encanamento, Vila Anhanguera, Mongaguá/SP; (e) pastoreando mamão, Ponta da Praia, Santos/SP; (f) pastoreando folhagem, Bairro Suarão, Itanhaém/SP; (g) sobre vegetação, Vila Tupi/Itanhaém/SP; (h) pastoreando papelão, Vila Erminda, Peruíbe/SP.



Figura 8. Presença de *Achatina fulica* em restos de construção: (a) Bairro Aviação, Praia Grande/SP; (b) Parque das Bandeiras, São Vicente/SP; (c) Vila Couto, Cubatão/SP; (d) Jardim Casqueiro, Cubatão/SP; (e) Vila Lygia, Guarujá/SP e (f) Jardim Erminda, Peruíbe/SP;



Figura 9. (a) *Bradybaena similares*; (b) *Sarasinula marginata*; (c) *Subulina octona*; associados ao ambiente de (d) *Achatina fulica*, coletados em: a) Jardim Erminda, Peruíbe/SP, b) Bairro Samaritá, São Vicente/SP, c) Bairro Valongo, Santos/SP e d) Bairro Canto do Forte, Praia Grande/SP.

Houve dificuldade no encontro desses moluscos durante as coletas no município de Cubatão, uma vez que a maioria dos pontos se encontrava próxima à mata (Figura 10) e sujeitos à ação de predadores.



Figura 10. Visão geral dos locais de coleta no município de Cubatão, São Paulo, próximos à Mata Atlântica nos bairros: (a) Costa e Silva e (b) Parque São Luís (Fonte: Google Earth).

O tamanho médio dos moluscos coletados foi de 76,38 mm de comprimento, tendo como referência a distância da base ao ápice da concha (Tabela 1). Os valores de cada bairro avaliado por município encontram-se no Apêndice A.

Tabela 1. Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados nos nove municípios da Baixada Santista.

Municípios	Total coletado	Adultos jovens	Tamanho médio	Adultos	Tamanho médio
			(mm) \pm desvio padrão		(mm) \pm desvio padrão
Praia Grande	60	26	66,2 \pm 0,38	34	84,8 \pm 0,92
São Vicente	60	24	65,3 \pm 0,38	36	79,7 \pm 0,89
Santos	60	16	61,9 \pm 0,62	44	96,2 \pm 1,06
Cubatão	60	16	61,5 \pm 0,71	44	85,0 \pm 1,26
Mongaguá	60	11	63,9 \pm 0,51	49	80,8 \pm 0,75
Itanhaém	60	23	61,5 \pm 0,48	37	80,8 \pm 0,82
Peruíbe	60	19	64,7 \pm 0,29	41	81,9 \pm 0,80
Guarujá	60	19	66,5 \pm 0,33	41	84,4 \pm 0,10
Bertioga	60	19	65,1 \pm 0,31	41	83,4 \pm 0,94

As análises morfológicas e morfométricas foram realizadas a partir de amostras que já estavam confirmadas para a presença de *A. cantonensis* (Tabela 2). Foi possível diferenciá-las em dois grupos dos quais foram avaliadas 30 larvas de cada. Um dos grupos apresentou maior largura e menor comprimento do que os valores descritos na literatura e, por isso, foi caracterizado como L2. O outro grupo apresentou medidas compatíveis com L3 e foram assim caracterizadas.

As larvas apresentaram corpo filiforme, cutícula estriada no sentido transversal, com extremidade anterior arredondada onde se observam duas estruturas bem desenvolvidas, uma em forma de botão e outra em forma de haste (Figuras 11b e 12b), seguida por um esôfago longo (Figuras 11b e 12b), com comprimento médio de 145,2 μ m (L2) e 168,7 μ m (L3). Na extremidade posterior, a cauda se forma a partir da abertura posterior do sistema digestório (Figuras 11a e 12c) e apresentou a média de 29,1 μ m (L2) e 35,3 μ m (L3) (Tabela 2). Nessa região, observa-se também o detalhe da terminação caudal com entalhe típico (Figuras 11a e 12c) e o poro excretor (Figuras 11a e 12b) com média de 61,9 μ m

(L2) e 86 μm (L3). As medidas das larvas L2 e L3 de *A. cantonensis* são mostradas na Tabela 2.

Pela análise de componentes principais, foi possível diferenciar as larvas L2 das larvas L3, pois as larvas L3 possuem maiores comprimentos total, do esôfago e da cauda, além de menor largura (Figura 13).

Tabela 2. Medidas (μm) de larvas L2 e L3 de *Angiostrongylus cantonensis* recuperadas de *Achatina fulica* infectadas naturalmente, e características da cauda.

Características	L2		L3	
	Média \pm Desvio Padrão	Varição	Média \pm Desvio Padrão	Varição
Comprimento total	358,2 \pm 27,8	299,5 – 399,2	450,8 \pm 23,5	410,5 – 493,6
Largura	26,4 \pm 2,6	21,9 – 34,5	21,1 \pm 5,5	13,1 – 38,5
Comprimento do esôfago	145,2 \pm 22,2	107,4 – 236,0	168,7 \pm 8,8	149,3 – 185,4
Poros excretor	61,9 \pm 7,6	53,9 – 89,9	86,0 \pm 4,3	77,9 – 93,2
Tamanho da cauda	29,1 \pm 3,4	21,2 – 39,7	35,3 \pm 3,8	28,8 – 44,6
Terminação da cauda	afilada		afilada	



Figura 11. Larvas L2 de *Angiostrongylus cantonensis* isoladas de *Achatina fulica*: (a) Vista geral de larva L2, poro excretor (PE) e ponta da cauda com entalhe típico (PCT); (b) Detalhes da extremidade anterior e posterior mostrando a estrutura em forma de botão (EB), estrutura em forma de haste (EH) e esôfago (E). Escala 50 μ m.

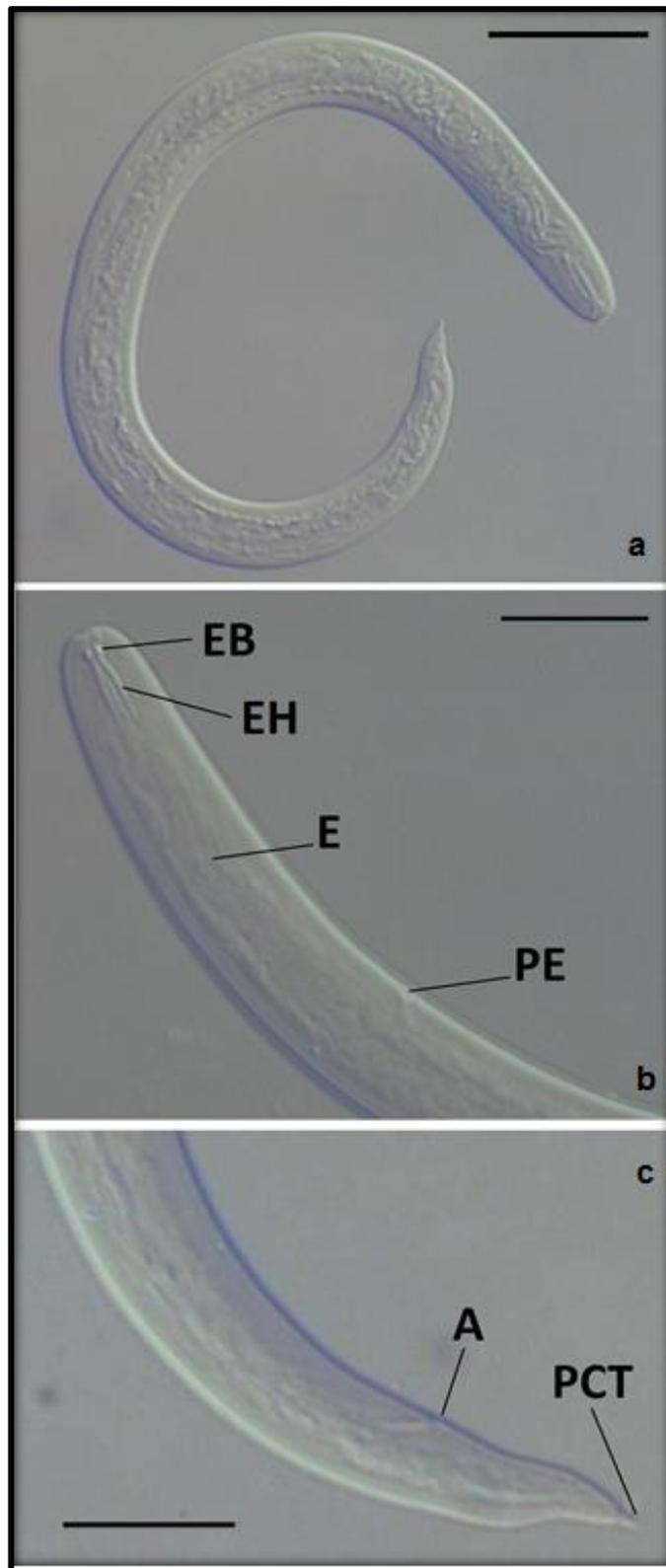


Figura 12. Larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* isolados de *Achatina fulica*. (a) Vista geral de larva L3 (Escala 50 μm). (b) Detalhes da extremidade anterior mostrando a estrutura em forma de botão (EB), estrutura em forma de haste (EH) esôfago (E) e poro excretor (PE) (Escala 25 μm). (c) Detalhes da extremidade posterior mostrando o ânus (A) e ponta da cauda com entalhe típico (PCT) (Escala 25 μm).

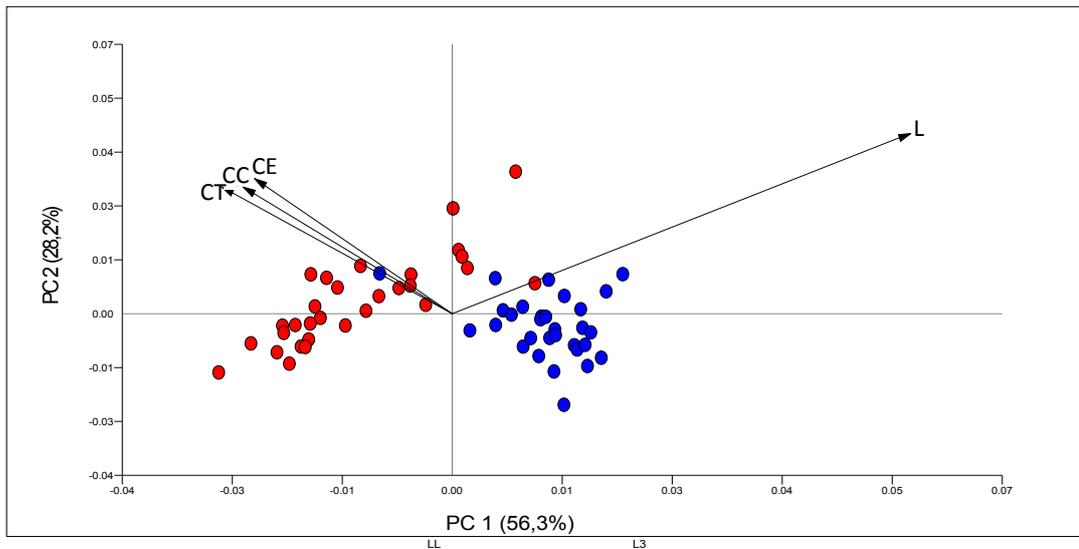


Figura 13. Vetores da PCA, mostrando a influência que cada variável teve na distribuição dos dados. Legenda: L = Largura; CT = Comprimento total; CE = comprimento do esôfago; CC = Comprimento da cauda (L2 - azul e L3 - vermelho).

A análise da distribuição espacial das larvas obtidas de *A. fulica* (Figura 14) mostra que cada município apresenta pelo menos um grande foco de caracóis abrigando larvas de nematóides. No caso do município de Guarujá e Praia Grande, são encontrados dois focos nos extremos da cidade, e os focos possuem maior amplitude nos municípios de Itanhaém e Bertioga.

Quando se analisa a distribuição espacial das larvas de *A. cantonensis* em *A. fulica* (Figura 15) nota-se que os municípios que apresentaram a menor frequência foram Cubatão e Guarujá. Por outro lado, o município com maior frequência encontrada, neste trabalho foi Bertioga.

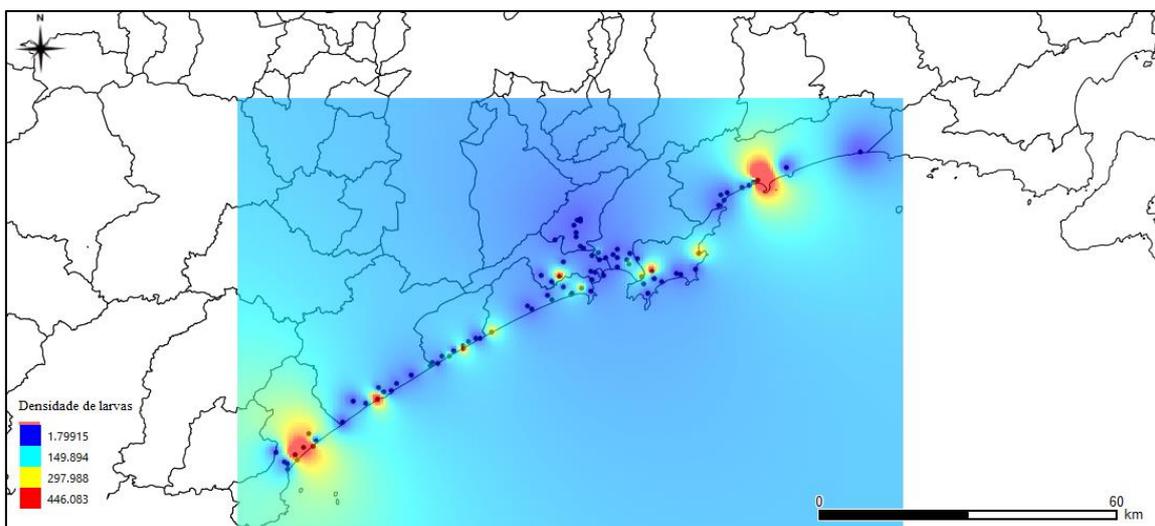


Figura 14. Análise da distribuição espacial da frequência de larvas de nematóides em *Achatina fulica*. Cores vermelha e laranja indicam maiores frequências.

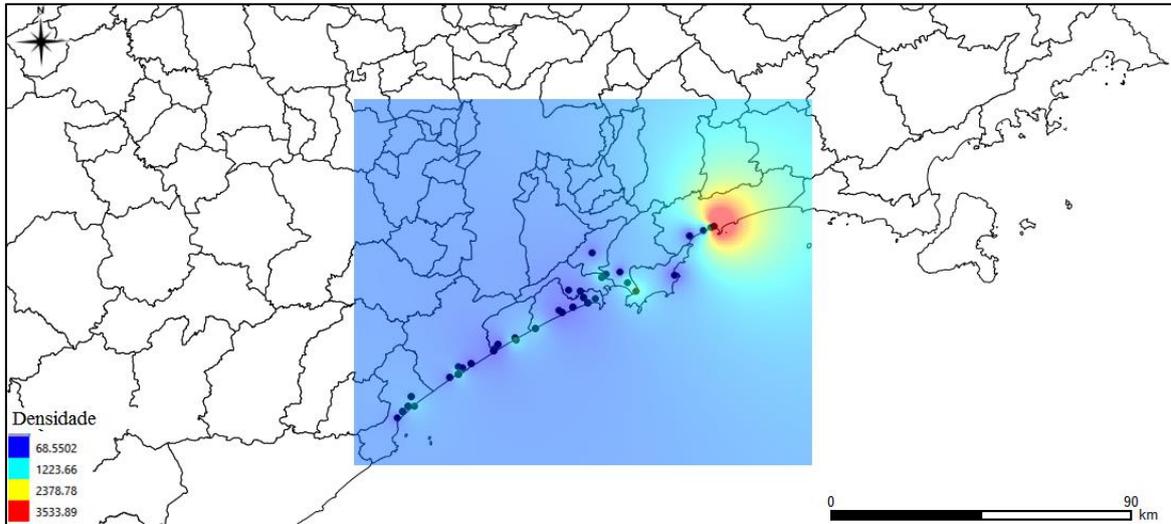


Figura 15. Análise da distribuição espacial da frequência de larvas de *Angiostrongylus cantonensis* em *Achatina fulica*. Cores vermelha e laranja indicam maiores frequências.

No total, foram analisados 90 pontos (bairros), dos quais 73 (81,11%) apresentaram moluscos com larvas de nematóides. Dos 540 caracóis analisados, 204 (37,77%) apresentaram larvas de nematóides (Apêndice B), dos quais 79 (38,72%) foram submetidas às análises moleculares; constatou-se a infecção por *A. cantonensis* em 63 (79,75%) moluscos (Tabela 3). A análise de PCR-RFLP da ITS2 rDNA confirmou a presença de larvas de *A. cantonensis* recuperadas de *A. fulica* (Figura 16). O número de larvas de nematóides por molusco variou de 1 a 9.723 em exemplares que apresentavam 61,0 e 70,0 mm de comprimento de concha respectivamente.

Tabela 3. Resumo quantitativo de moluscos *Achatina fulica* desde os coletados até os positivos para *Angiostrongylus cantonensis*, nos nove municípios da Baixada Santista.

Municípios	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados naturalmente com larvas de nematoides (% entre parênteses)	Nº de moluscos analisados para a presença de <i>A. cantonensis</i>	Porcentagem de moluscos analisados para a presença de <i>A. cantonensis</i>	Nº de moluscos infectados naturalmente com <i>A. cantonensis</i> entre os analisados (% entre parênteses)
Praia Grande	60	30 (50,00)	16	55,96	13 (81,25)
São Vicente	60	20 (33,00)	03	15,00	03 (100,00)
Santos	60	16 (26,66)	04	25,00	04 (100,00)
Cubatão	60	16 (26,66)	02	12,50	01 (50,00)
Mongaguá	60	25 (41,66)	13	52,00	11 (84,61)
Itanhaém	60	28 (46,66)	21	75,00	13 (61,90)
Peruíbe	60	34 (56,66)	09	26,47	09 (100,00)
Guarujá	60	14 (23,33)	03	21,42	03 (100,00)
Bertioga	60	21 (35,00)	08	38,09	06 (75,00)
Total	540	204 (37,77)	79		63 (79,75)

Tabela 4. Número de larvas de nematóides e de *Angiostrongylus cantonensis* em lotes de moluscos *Bradybaena similares*, *Subulina octona* e *Sarasinula marginata* nos municípios de Praia Grande/SP e Santos/ SP.

Local	Praia Grande	Santos			
	Centro	Valongo	Ponta da Praia		
Lote	<i>B. similares</i>	<i>S. octona</i>	<i>B. similares</i>	<i>S. octona</i>	<i>S. marginata</i>
01	137	07	0	5	*52
02	514	0	0	0	-
03	48	0	0	0	-
04	131	19	0	1	-
05	131	0	0	1	-
06	*10	1	1.100	0	-
07	0	1	-	0	-
08	1081	2	-	126	-
09	-	0	-	45	-
10	-	0	-	-	-
11	-	*3	-	-	-
12	-	0	-	-	-
13	-	4	-	-	-
14	-	0	-	-	-

* Lotes de moluscos positivos para *Angiostrongylus cantonensis*.

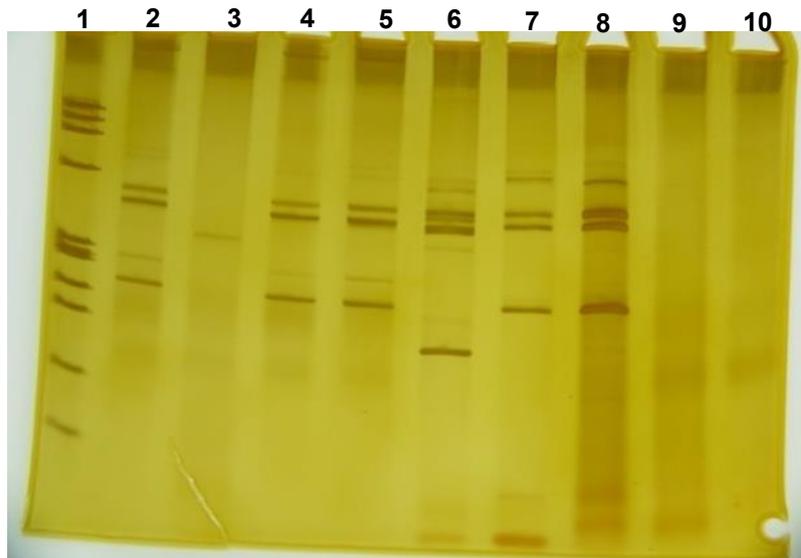


Figura 16. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (650pb *Angiostrongylus cantonensis*) obtidos pela digestão da região ITS2 do rDNA com a enzima *Cla*I. Canaleta 1: Padrão de peso molecular phi x 174; Canaleta 2: larvas de *Angiostrongylus cantonensis* oriundas de Bertioga/SP; Canaletas 3, 9, 10: DNA não amplificou; Canaletas 4, 5: larvas de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de Mongaguá/SP; canaleta 6: amostra de *Angiostrongylus costaricensis* (Laboratório de Helmintoses Intestinais do Instituto René Rachou, FIOCRUZ); canaleta 7: amostra de *Angiostrongylus cantonensis* (Laboratório de Helmintoses Intestinais do Instituto René Rachou, Fiocruz); Canaleta 8: larvas de *Angiostrongylus cantonensis* oriundas de Praia Grande/SP

Não foi encontrada relação entre o número de larvas de *A. cantonensis* e o comprimento da concha ($F_{1,62} = 0,06$; $p = 0,79$) e nem entre a média de larvas encontradas em indivíduos jovens adultos e adultos ($t = 0,85$; $p = 0,39$, GL = 62) (Figura 17). Foram encontrados 63 indivíduos infectados, sendo 41 adultos e 22 jovens adultos. Essa diferença mostrou – se significativa ($X^2 = 5,06$; $p = 0,02$) (Figura 18).

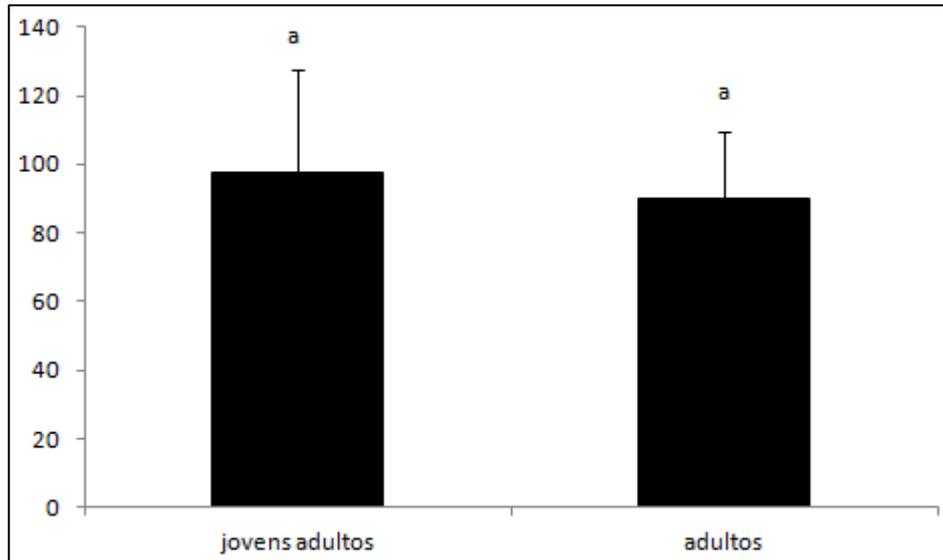


Figura 17. Médias de larvas de *Angiostrongylus cantonensis* de jovens adultos e adultos e comprimento da concha, letras iguais significam semelhanças entre os tratamentos (Teste *t*; $p = 0,39$).

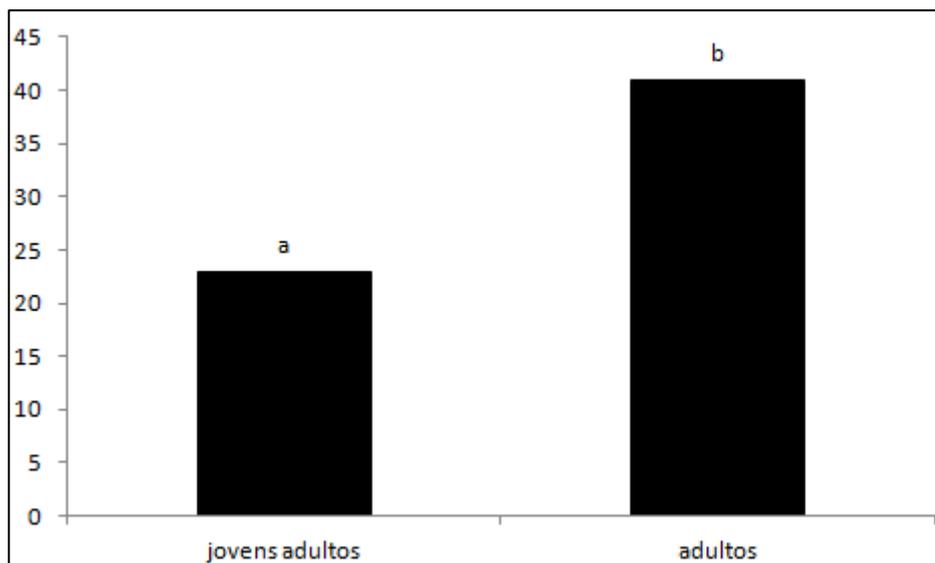


Figura 18. Número de adultos jovens e adultos infectados com larvas de *Angiostrongylus cantonensis*, letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos (Teste χ^2 ; $p = 0,02$).

7. Discussão

A partir de sua distribuição original, no leste Asiático, o *A. cantonensis* espalhou-se ao longo de muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo inteiro durante a 2ª 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 & Palombo, 1992). Quando introduzido em uma nova área o parasita pode estabelecer-se facilmente na fauna local, uma vez que um grande número de espécies de moluscos pode atuar como hospedeiro intermediário e/ou paratênico - desde que ratos estejam presentes no local.

Os resultados apresentados neste estudo confirmam a não especificidade do *A. cantonensis* em relação ao hospedeiro intermediário devido ao parasita ter sido encontrado em grande variedade de moluscos, incluindo *S. marginata*, *S. octona*, *B. similares* e *A. fulica*. Esses moluscos também já foram observados infectados com *A. cantonensis* em estudos realizados na América do Sul por outros autores (Caldeira *et al.*, 2007; Pincay *et al.*, 2009; Maldonato *et al.*, 2010; Thiengo *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012). Entre eles, *A. fulica* desempenha um papel crucial na dispersão mundial de *A. cantonensis* (Kliks & Palumbo, 1992; Thiengo *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2009b), uma vez que está presente na maioria das áreas onde esse nematóide é endêmico.

Até o momento, cerca de 2.800 casos de meningite eosinofílica humana causada por *A. cantonensis* foram documentados na literatura. Esses casos provavelmente representam apenas uma fração, pois muitos não foram relatados e/ou reconhecidos nas últimas três décadas (Kliks & Palombo, 1992). Casos isolados da doença têm sido relatados no Brasil nos últimos anos (Caldeira *et al.*, 2007; Thiengo *et al.*, 2010; Ciaravolo *et al.*, 2010; Espírito-Santo *et al.*, 2013). Assim, é plausível que *A. cantonensis* continuará a se espalhar para novas regiões, especialmente nas cidades costeiras, aumentando o risco de meningite eosinofílica em seres humanos.

A ampla distribuição de *A. fulica* em todo o país, predominantemente em áreas urbanas, tem contribuído para a dispersão e domicialização do *A. cantonensis* e reforça a ameaça apresentada por esta espécie de molusco. A literatura mundial descreve esse fenômeno como umas das causas principais da propagação desta zoonose (Kliks & Palombo, 1992; Lima *et al.*, 2009; Lv *et al.*, 2009a).

Essa espécie de molusco causa impacto na endemicidade, dispersão e domicialização do *A. cantonensis* no mínimo, de três maneiras: 1) a invasão desses moluscos facilita o estabelecimento do ciclo de vida do parasita e, portanto, aumenta as chances de exposição de moluscos nativos para *A.*

cantonensis em áreas endêmicas; 2) a invasão desses caracóis pode acelerar a difusão de *A. cantonensis*, uma vez que eles têm um grande potencial para ampliar a sua distribuição e se expandem rapidamente, resultando no estabelecimento local do caracol e do parasita em áreas anteriormente não endêmicas (Kliks & Palombo, 1992); e 3) um dos fatores mais importantes para o estabelecimento e dispersão destes moluscos é a presença humana (Lv et al., 2009b; Kliks & Palumbo, 1992), pois são frequentemente detectados em ambientes alterados e com muita disponibilidade de alimento e refúgio como lixo urbano, terrenos baldios, hortas e jardins (Fischer & Costa, 2010).

Durante a realização deste trabalho observou-se que, dos 90 pontos de coleta, 82% possuíam algum tipo de lixo ou entulho. Esses dados reforçam a preferência de *A. fulica* por ambientes alterados e essa preferência também foi registrada por vários autores em regiões onde este molusco foi introduzido (Lake & O'Dowd, 1991; Kliks & Palombo, 1992; Teles *et al.*, 1997; Simberloff, 2003). Pacheco & Martins (1998) em seus estudos constataram a relação entre a quantidade de consumo de cálcio com o crescimento e tamanho do molusco. A preferência de *A. fulica* por locais com grande disponibilidade de concreto e cimento como fontes de carbonado de cálcio para seus processos fisiológicos, como reparo da concha e reprodução, também foi observada por Paiva (2004). A necessidade de cálcio pode levar um molusco a raspar a concha do coespecífico (Fischer & Costa, 2010). Os resultados aqui descritos confirmam esses dados, pois também foi encontrada uma grande quantidade de moluscos em torno dessas estruturas.

Fischer & Costa (2010) verificaram que restos de comida e resíduos industriais, como papel, isopor e materiais de construção, além de oferecerem substratos para *A. fulica* podem também ser consumidos, favorecendo o estabelecimento dessa espécie em áreas urbanas. O grande volume de resíduos sólidos gerados pela ação antrópica no ambiente urbano favorece o aumento da população da espécie, pois gera abrigo, menor exposição a predadores e disponibiliza ampla variedade de alimentos.

No início da introdução de *A. fulica* no Brasil, nos anos 90, esse molusco não possuía predadores naturais e sua população cresceu exponencialmente. Com o surgimento da predação, por répteis e aves principalmente, o crescimento populacional dos caracóis africanos foi reduzido,

associado a campanhas isoladas de controle e erradicação veiculadas pelos órgãos governamentais. Paralelamente, *A. fulica* alcançou o ambiente urbano e aí se estabeleceu facilmente, também pela ausência inicial de predadores naturais e farta oferta de alimento.

Neste estudo, dois pontos de coleta no município de São Vicente ofereceram dificuldade para o encontro de caracóis africanos. O ponto de coleta localizado no bairro da Biquinha (Morro dos Barbosas) é um local alto, com mata e residências de alto padrão onde, segundo relato de moradores, há predação de *A. fulica* por gaviões; e no ponto do bairro Japuí, localizado no sopé de uma elevação com Mata Atlântica (Reserva Ecológica Xixová-Japuí), os relatos foram de predação tanto dos moluscos como de seus ovos, por gambás. No município de Cubatão/SP houve dificuldades de encontrar espécimes para coleta em vários pontos onde, segundo relato de moradores algumas espécies de lagartos estariam predando tanto os indivíduos quanto seus ovos, o que provavelmente fez com que a população diminuísse nesses locais. O município de Cubatão/SP localiza-se entre as escarpas da Serra do Mar e planície costeira. A maior parte do Parque Estadual da Serra do Mar fica dentro do município, em áreas no entorno da Rodovia Anchieta, que liga a Baixada Santista à capital paulista. Sendo o Parque Estadual da Serra do Mar uma reserva da Mata Atlântica e hábitat natural de várias espécies de lagartos e que a maioria dos locais de coleta neste município coincidiu com terrenos baldios próximos à mata é plenamente possível que esses lagartos tenham encontrado, em um primeiro momento, fartura de alimento disponível em um ambiente urbano e, posteriormente, tenha ocorrido diminuição da população desses moluscos em alguns pontos no município.

A presença de predadores também foi um fator limitante na distribuição de *A. fulica* nas Ilhas Christmas, localizadas no Oceano Índico, onde observaram sua ocorrência apenas nas áreas alteradas da Ilha e que seu estabelecimento nas áreas naturais foi impedido pelo caranguejo nativo *Gecarcoidea natalis* (Pocock, 1888). Ambos competem pelo mesmo hábitat de serapilheira, que utilizam como refúgio e alimento. Quando os moluscos são transferidos para a região nativa são facilmente consumidos pelos caranguejos restringindo sua distribuição nas áreas antropizadas (Lake & O' Dowd, 1991).

A predação de *A. fulica* por animais silvestres apresenta dois aspectos antagônicos: primeiro: a espécie invasora ao se confrontar com predadores terá sua capacidade de proliferação limitada podendo entrar em equilíbrio, uma vez que a predação é uma forma de resistência do meio; segundo: os predadores da região estarão expostos a infecções por uma gama de parasitas - entre eles, o *A. cantonensis* – tornando-se disseminadores de infecções onde outrora não havia, pois estarão levando consigo cargas parasitárias para as áreas silvestres facilitando o ciclo. Como o *A. cantonensis* não possui especificidade quanto aos seus hospedeiros intermediários – uma gama variada de moluscos-, há maior probabilidade de transmissão das larvas L3 para outros mamíferos e lacertílios. Em um estudo realizado em cinco províncias da Tailândia, 96% (21/22) dos lagartos *Varanus bengalensis* (Daudin, 1802) estavam infectados com *A. cantonensis* (Eamsobhana, 2013). Embora lagartos sejam hospedeiros paratênicos e nestes os parasitas não se desenvolvam, eles desempenham um papel importante à medida que aumentam as chances para a infecção dos hospedeiros definitivos. A efetividade desses predadores como reguladores da população de *A. fulica* deve ser estudada mais detalhadamente.

O fato de o número de moluscos infectados com larvas de *A. cantonensis* ter variado com o tamanho (Figura 19) sugere que a idade pode regular o padrão da infecção, como já descrito anteriormente (Noda *et al.*, 1987; Sithihaworn *et al.*, 1991), embora nem todos os moluscos tenham igual chance de infecção. Vários fatores podem explicar essa observação: 1) os caracóis de tamanhos diferentes possuem mobilidades diferentes e, conseqüentemente, diferentes graus de exposição às fezes dos roedores; 2) existe uma heterogeneidade na distribuição de fezes de roedores nas áreas - ratos ocupam apenas parte da área e os caracóis que vivem fora deste território, tem menos chance de se infectar (Sithihaworn *et al.*, 1991); 3) de acordo com Mead (1961), alguns caracóis africanos se alimentam preferencialmente de fezes de roedores; 4) segundo Fischer e Costa (2010), moluscos jovens alimentam-se de plantas vivas e moluscos adultos preferem alimentos em decomposição, sendo 75% de seu alimento composto por detritos; 5) Simião & Fischer (2004) relataram que o tamanho de *A. fulica* diferiu em diferentes substratos em que foram encontradas, sendo que entulhos apresentaram indivíduos de menor tamanho, e o lixo, os de maior tamanho; 6) o hábito alimentar dos moluscos de maior porte pode facilitar o

seu encontro com roedores uma vez que ambos têm dietas semelhantes; 7) o fato de as fezes poderem prolongar a sobrevivência da primeira fase das larvas (Brokelman *et al.*, 1979), também facilita a transmissão para os caracóis adultos, uma vez que indivíduos de maior tamanho possuem alta capacidade de consumo e a ingestão do alimento é uma via de infecção passiva; e 8) a infecção no hospedeiro intermediário ocorre também por penetração ativa das larvas L1 e, assim, caracóis maiores oferecerão maior área de penetração.

De acordo com os nossos resultados não houve diferença significativa entre o número de larvas de *A. cantonensis* e o tamanho do molusco (Figura 18), e nem entre a média de larvas de *A. cantonensis* recuperadas em indivíduos adultos jovens e adultos. Diferentes resultados foram obtidos por outros autores (Noda *et al.*, 1987; Sithihaworn *et al.*, 1991). Essas diferenças podem ser decorrentes das diferentes faixas de comprimento utilizadas para definir os grupos avaliados. Em nossos estudos utilizamos os parâmetros adotados por Simião & Fischer (2004) que considera moluscos de 40 mm a 70 mm como adultos jovens e acima de 70 mm, como adultos, enquanto que Noda *et al.* (1987) considerou como moluscos maduros todos aqueles que mediam acima de 50 mm e Sithihaworn *et al.* (1991), aqueles que mediam 46 mm ou mais. Estudos feitos em laboratório por Sithihaworn *et al.* (1991) com *A. fulica* demonstraram que os moluscos de tamanho entre 40 - 80 mm foram igualmente susceptíveis à infecção com *A. cantonensis* e não houve evidência de resistência inata associada com a idade.

As larvas L3 encontradas nos moluscos apresentam medidas compatíveis com *A. cantonensis*, similares àquelas obtidas por Ash (1970) e Thiengo *et al.* (2010) (Tabela 5). O detalhe da cauda terminando em ponta fina observado em nossos estudos também é típico da espécie, mas, segundo Ash (1970) características morfológicas e morfométricas não se constituem isoladamente em fatores de identificação taxonômica precisos.

Em seus estudos Lv *et al.* (2009a) observaram que antes da segunda muda as características principais da larvas L2 foram semelhantes as das L3, como mostrado na Figura 11b e 12b, duas estruturas semelhantes em forma de haste e botão.

Tabela 5. Comparação morfométrica (μm) de larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* e características da cauda.

Características	Havai e Nova	Pernambuco –	Baixada Santista -
	Caledônia *	Brasil **	Brasil
	Média	Média	Média
	Variação	Variação	Variação
Comprimento total	474 (425 - 524)	460,4 (460,3 - 544,6)	450 (410,5 - 493,6)
Largura	26 (23 - 34)	24,8 (18,5 - 31,9)	21,1 (13,1 - 38,5)
Comprimento do esôfago	181 (167 - 194)	168,4 (129,6 - 189)	168,7 (149,3 - 185,4)
Poros excretor	93 (78 - 105)	157,9 (79,6 - 200)	86,0 (77,9 - 93,2)
Primórdio genital	174 (152-191)	40,8 (22,2-65,9)	-
Tamanho da cauda	39 (34 - 44)	41,2 (27,7 - 89,3)	35,3 (28,8 - 44,6)
Terminação da cauda	afilada	afilada	afilada

*Ash,1970; **Thiengo *et al.*, 2010.

Rocco (2007) verificou uma positividade de 34,21% em *A. fulica* infectadas naturalmente com larvas de nematóides. Nós observamos uma positividade de infecção por larvas de nematóides de 37,77% (204/540) quando analisamos os moluscos individualmente, porém se levamos em conta que em 73 dos 90 pontos analisados havia um ou mais indivíduos infectados, podemos admitir um valor de 81,11% de infecção nos bairros visitados.

Os resultados demonstram a presença de *A. fulica* infectada naturalmente com *A. cantonensis* na área urbana dos nove municípios da Baixada Santista com uma taxa de infecção de 79,75% (63/79) nos moluscos analisados. A Baixada Santista está localizada no litoral do Estado de São Paulo e suas características climáticas com predominância de temperaturas entre 24 °C e 25 °C e umidade relativa alta (80%) são apropriadas para o desenvolvimento do ciclo biológico da *A. fulica* e do *A. cantonensis*. Ishii (1984) observou que as larvas L3 de *A. cantonensis* desenvolvem-se melhor em temperaturas que variam entre 20 °C e 30 °C.

Os municípios da Baixada Santista são caracterizados por possuírem muitos terrenos baldios onde frequentemente é jogado lixo orgânico e em todos os municípios há residências de veranistas que ficam sem cuidados durante o período letivo.

O encontro de *A. fulica* infectada com *A. cantonensis* em 100% dos bairros analisados (38 bairros) caracteriza implicações sanitárias importantes no que diz respeito à transmissão de doenças. Esses moluscos foram coletados em terrenos baldios altamente contaminados pela atividade antrópica, onde é comum a presença de roedores, o que facilita o contato com o hospedeiro definitivo. Este fato pode justificar a alta taxa de infecção 79,75% (63/79) dos moluscos com larvas de *A. cantonensis*. Maldonato *et al.* (2010) e Thiengo *et al.* (2010) constataram uma taxa de infecção inferior de *A. fulica* naturalmente infectadas com *A. cantonensis*, 21,25% (44/207) e 42% (14/33) respectivamente.

Os resultados indicam a necessidade de mais atenção para este parasita emergente, através de campanhas de sensibilização junto a comunidades locais e médica, sistema de vigilância sanitária, melhoria da educação sanitária e informações sobre a ação de manejo adaptada a cada realidade. Pesquisas sobre a distribuição de hospedeiros intermediários e paratênicos em áreas peridomiciliares e a compatibilidade parasita-hospedeiro devem ser investigados para aprofundar nossa compreensão na dinâmica de transmissão. No Brasil, há poucos estudos sobre a ação da *A. fulica* e de outras espécies de moluscos como hospedeiros intermediários de *A. cantonensis* e seus papéis na saúde pública. Pesquisas anteriores (Caldeira *et al.*, 2007; Thiengo *et al.*, 2010; Maldonato *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012) e este estudo comprovam a presença de *B. similis*, *S. octona* e *S. marginata* naturalmente infectadas com *A. cantonensis*.

A intensificação da vigilância malacológica visando o controle e detecção da infecção natural em moluscos em áreas vulneráveis para a introdução do *A. cantonensis* também é necessária para evitar a propagação e surtos de meningite eosinofílica, assim como a desratização dos locais e a mobilização social da população que deverá ser aconselhada com informações sobre o que fazer com o lixo doméstico (recipientes, locais, etc.), limpeza de terrenos, remoção de entulhos, entre outras atitudes.

É necessária a adoção de medidas como a implantação de um programa de vigilância da meningite eosinofílica adequando o preparo dos médicos para fazer o diagnóstico diferencial quando apropriado.

Tendo em vista que 82% dos terrenos baldios onde foram coletados os caracóis possuíam algum tipo de lixo ou entulho torna-se necessária a

implantação de programas de sensibilização da comunidade tanto com relação à espécie invasora, quanto ao manejo do seu lixo. A coleta diária ou em dias previamente agendados pelos órgãos públicos e de pleno conhecimento da população e a fiscalização efetiva são questões de infraestrutura que devem ser urgentemente tratadas e discutidas com as autoridades. Essas ações irão dificultar a proliferação de diversos hospedeiros intermediários e de roedores, pois deixará de proporcionar instalação e alimento para todos.

Outra providência a ser tomada é não permitir que pneus, latas, entulhos, plásticos, tijolos, telhas, madeiras e lixo em geral, fiquem espalhados pelo quintal ou terreno, favorecendo a proliferação da *A. fulica* além de albergar outras pragas (Vasconcelos & Szabó, 2004).

A coleta manual ainda permanece como a melhor forma de controle, sendo que novos estudos da biologia, ecologia e comportamento da *A. fulica* são importantes para o encontro e formulações de melhores estratégias de controle. Além disso, é importante o envolvimento da comunidade que convive com essa espécie para que o controle seja eficiente, sendo essencial o fornecimento de informações sobre o método de manuseio, uma vez que, se manipulados de forma incorreta, podem transmitir infecções parasitárias.

Através da análise da distribuição espacial podem-se identificar as áreas onde estão ocorrendo os maiores focos de *A. fulica* abrigo larvas de nematóides (Figura 14) e infectadas naturalmente com *A. cantonensis* (Figura 15). Esses dados são especialmente úteis - para a vigilância epidemiológica dos municípios da Baixada Santista - e esperamos que as autoridades de saúde pública utilizem essas informações para estabelecer políticas para a vigilância e planejamento de ações preventivas destinadas a limitar a propagação dos hospedeiros definitivos e intermediários de *A. cantonensis* nestas áreas estabelecidas.

8. Conclusões

- Todos os municípios da Baixada Santista apresentaram *A. fulica* infectada naturalmente com *A. cantonensis*.
- A metodologia empregada foi eficiente na obtenção de larvas de nematóides a partir dos moluscos analisados.

- A avaliação molecular identificou larvas de *A. cantonensis* entre as larvas obtidas.
- Os estudos morfológicos e morfométricos identificaram duas fases larvais: L2 e L3 infectantes de *A. cantonensis*.
- A presença do caracol gigante africano está relacionada à abundância em algum tipo de lixo ou entulho.
- A área de maior incidência de larvas de *A. cantonensis* foi o município de Bertioga.

9. Referências bibliográficas¹

Alicata J. E. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Adv. Parasitol.* v.3, p.223-248, 1965.

Alicata, J. E. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) as a causative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. *Can. J. Zool.* v.40, p.5-8, 1962.

Alowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database, p.1-12, 2004.

Alto, W. Human infections with *Angiostrongylus cantonensis*. *Pacific Health Dialog.* V.8 , n.1, p.176-182, 2001.

Andersen, E., Gubler, D.J., Sorensen, K., Beddard, J., Ash, L. R. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Puerto Rico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.35, n.2, p.319-22, 1986.

Ash, L. R. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). *J. Parasitol.* v.56, n.1, p.249-53, abril 1970.

¹ Volpato, E. S. N.; Silva, R. C.; Pizzani, L.. Manual de apresentação de trabalho científico: tese, dissertação e monografia - Botucatu: Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação, 2012. 35p.

Ash, L. R. Observations on the role of mollusks and planarians in the transmission of *Angiostrongylus cantonensis* infection to man New Caledonia. Rev. Biol. Trop. v.24, n.1, p.163-174, 1976.

Bhaibulay, M. Snail borne parasitic zoonoses: Angiostrongyliasis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health, v.22, p.189-93, 1991.

Blouin, M. S., Yowell, C. A., Courtney, C. H., Dame, J. B. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. Mol. Biol. Evol. 15: 1719-1727, 1998.

Brockelman, C. R., Chavalsilf, C., Sitthitavorna, P. *Angiostrongylus cantonensis* infectivity of first stage larvae in the presence of rat fecal materials as tested by the in vitro cultivation technique. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, v.10, n.1 p.164-5, 1979.

Caetano, F. A. M. Estudo comparativo do aparelho reprodutor do molusco *Achatina fulica* criado em cativeiro e asselvajado. 2005. 61f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Caldeira, R. L., Carvalho, O. S., Mendonça, C. L. F., Graeff-Teixeira, C., Silva, M.C. F., Ben, R., Maurer, R., Lima, W. S., Lenzi, H. L. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *Angiostrongylus cantonensis*, and *Angiostrongylus vasorum* by Polymerase Chain reaction and restriction Fragment Length Polymorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.98, n.8, p.1039-43, dezembro 2003.

Caldeira, R. L., Mendonça, C. L. G. F., Goveia, C. O., Lenzi, H. L. Graeff-Teixeira, C., Lima, W. S., Mota, E. M., Pecora, I. L., Medeiros, A. M. Z. First Record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.102, n.7, p.887-89, novembro 2007.

Carvalho, O. S., Scholte, R. G. C., Mendonça, C. L. F., Passos, L. K. Caldeira, R. L. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in molluscs from

harbour areas in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.107, n.6, p.740-46, setembro 2012.

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. v.74, n.6; p.1122-4, 2006.

Ciaravolo, R. M. C., Pinto, P. L. S., Mota, D. J. G. Meningite eosinofílica e a infecção por *Angiostrongylus cantonensis*: Um agravo emergente no Brasil. Vector Inf. Tec. Cient. Sucen, n.8, p.7-8, dezembro 2010.

Cognato, B. B., Marassutti, A. L., Silva, A. C. A., Graeff-Teixeira, C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.46, n. 5, p. 664-665, setembro-outubro 2013.

Cross, J. H. Public health Importance of *Angiostrongylus cantonensis* it relatives. Parasitol. Today, v.3, n.12, p.367-69, 1987.

Eamsobhana, P & Yong, H. S. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) Int. J. of Inf. Dis. 13: 425-431, 2009.

Eamsobhana, P. Angiostrongyliasis in Thailand: Epidemiology and laboratory investigations. Hawaii Journal of Medicine & Public Health, v.72, p. 28-32, 2013.

Espírito-Santo, M. C. C., Pinto, P. L. S., Mota, D. J. G., Gryscek, R. C. B. The first of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.55, n.2, p.129-132, março-abril 2013.

Fischer, M. L. & Colley, E. Espécie invasora em reservas naturais: caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca–Achatinidae) na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. Biota Neotrop. v.5, n.1, p.1-18, 2005.

Fischer, M. L. & Costa. L. C. M. O caramujo gigante africano *Achatina fulica* no Brasil. Editora Champagnat: Curitiba/PR. 2010. 269p

Gasser, R. B., Chilton, N. B., Hoste, H., Beveridge, I. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res.* v.21, n.10, p.2525-2526, maio 1993.

Hughes, P. A., Magnet, A. D., Fishbain, J.T. Eosinophilic meningitis: a case series report and review of the literature. *Mil. Med.* v.168, n.19, p.817-21, outubro 2003.

Ishii, A. L. Effects of temperatura on the larval desenvolvimento de *Angiostrongylus cantonensis* in intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. *Z. Parasitenk.* v.70, n.3, p.375-379, 1984.

Kliks, M. M. & Palumbo, N. E. 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.* v.34, n.2, p.199-212, 1992.

Koo, J., Pien, F. D., Kliks, M. M. *Angiostrongylus (Parastrongylus)* eosinophilic meningitis. *Rev. Infect. Dis.* v.10, n.6, p.1155-1162, 1988.

Kuberski, T. & Wallace, G. D. Clinical manifestations of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. *Neurology*, v.29, n.12, p.1566-70, dezembro 1979.

Lai, C. H., Yen, C. M., Chin, C., Chung, H. C., Kuo, H. C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* after ingestion of raw frogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.76, n.2, p.399-402, fevereiro 2007.

Lake, P. S. & O' Dowd, D. J. Red crabs in rain forest Christmas Island: Biotic resistance to invasion by an exotic snail. *Oikos*, v.62, n.1, p.25-29, outubro 1991.

Lima, A. R., Mesquita, S. D., Santos, S. S., Aquino, E. R., Rosa, L.R., Duarte, F. S., Teixeira, A. O., Costa, Z. R., Ferreira, M. L. Alicata disease; neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq. Neuropsiquiatr.* v.67, n.4, p.1093-1096, 2009.

Lindo, J. F., Waugh, C., Hall, J., Cunningham-Myrie, C., Ashley D., Eberhard, M, L., Sullivan, J, J., Bishop, H. S., Robinson, D, G., Holtz, T., Robinson, R, D. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. *Emerg. Infect. Dis.* v.8, n.3, p.324-326, fevereiro 2002.

Lv, S., Zhang, Y., Liu, H., Zhang, C., Steinmann, P., Zhou, X., Utzinger, J. *Angiostrongylus cantonensis*: morphological and behavioral investigation within the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. *Parasitol. Res.* v.104 p.1351-59, janeiro 2009a.

Lv, S., Zhang, Y., Liu, H.X., Hu, L., Yang., Steinmann, P., Chen, Z., Wang, Y. L., Utzinger , J., Zhou, N. X. Invasive snails and an emerging infectious disease: results from the first national survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *Plos Negl. Trop. Dis.* v.3, n.2, p.368-375, fevereiro 2009b.

Lv, S., Zhang, Y., Steinmann, P., Zhou, N. Z. Emerging Angiostrongyliasis in Mainland China. *Emerg Infect. Dis.* v.14, n.1, p.161-165, janeiro 2008.

Maldonato, A. Jr; Simões, R. O; Oliveira, A. P.; Mota, E. M; Fernandez, M. A; Pereira, Z. M; Monteiro, S. S; Torres E. J; Thiengo, S. C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.105, n.7, p.938-41, novembro 2010.

McKeand, J.B. Molecular diagnosis of parasitic nematodes. *Parasitol.* 117: 87-96, 1998.

Mead, A. R. The giant african snail: A problem in economic malacology. University of Chicago Press, Chicago, p.257, 1961.

Moreira, V. L. C., Giese, E. G., Melo, F. T. V., Simões, R. O., Thiengo, S. C., Maldonato Jr., A., Santos, J. N.. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: Natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. *Acta Tropica*, v.125, n.1, p.90–97, 2013.

Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes. Am. J. Trop. Med. Hyg. v.22, n.5, 613-621, 1973.

Namue, C. & Wongsawad, C. A survey of helminth infection in rats (*Rattus spp*) from Chiang Mai Moat. Southeast. Asian J. Trop. Med. Public. Health v.28, Suppl. 1, p.179-83, 1997.

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, v.102, n.1, p.49-52, fevereiro 2007.

Noda, S., Uchikawa, R., Mataayoshi, S., Watanabe, W., Sato, A. Observations on the transmission of *Angiostrongylus cantonensis* from snail to rodent. Journal of Helminthology, v.61, p.241-6, 1987.

Nomura, S. & Lin, H. First clinical case of *Hemostrongylus ratti*. Am J. Trop. Med. Hyg. v.13, p.589-90, 1945.

Oliveira, J. C. S., Corrêa, K. J. G., Vasconcelos, H. C. G. Ocorrência de *Achatina fulica* (Mollusca: Pulmonata: Achatinidae) em três bairros da cidade de Santana, Amapá. Biota Amazônica, v.3, n.1, p.9-12, 2013.

Pacheco, P., Martins, M. F. O escargot. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.55, p.43-46, 1998.

Paiva, C. L. *Achatina fulica* (Moluscos): Praga agrícola e ameaça à Saúde Pública no Brasil, 2004. Disponível em: <http://www.geocites.ws/lagopaiva/achat_tr.htm>. Acesso em: 20 jan. 2008.

Panackel, C., Vishad, G., Cherian, K., Vijayakumar, K., Sharma, R. N. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. Indian J. Med. Microbiol. v.24, n.3, p.220-21, 2006.

Pien, F. D. & Pien B. C. *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis. Int. J. Infect. Dis. v.3, n.3, p.161-63, 1999.

Pincay, T., Garcia, L., Decker, O., Martini, L., Moreira, J. M. Angiostrongyliasis due to *Parastrongylus (Angiostrongylus) cantonensis* in Ecuador. Bol. Epidem. Ecuador, v.6, p.25-32, 2009.

Prociv, P., Spratt, D. M., Carlisle, M. S. Neuro-angiostrongyliasis: unresolved issues. Int. J. Parasitol. v.30, ed. 12-13, p.1295–303, 2000.

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. v.24, n.6, p.921-931, 1975.

Quantum GIS Development Team. Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>. 2011.

Qvarnstrom, Y., Bishop, H. S., Silva, A. J. Detection of rat lungworm in intermediate, definitive, and paratênico hosts obtained from environmental sources. Hawaii Journal of Medicine & Public Health, v.72, p. 63-69, 2013.

Raccurt, C. P., Blaise, J., Durette-Desset, M. C. Presence of *Angiostrongylus cantonensis* in Haiti. Trop. Med. Int. Health, v.8, p.423-26, 2003.

Rachford, F. W. Potential intermediate and paratenic hosts for *Angiostrongylus cantonensis*. J. Parasitol. v.61, n.6, p.1117-1119, dezembro 1975.

Raut, K. & Barker, G. *Achatina fulica* Bowdich, 1822 and other Achatinidae pest in tropical agricultura. Molluscs as Croup Pest. 55-144, 2002.

Rocco, S. C. 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. 2007. 140f. Tese (Doutorado) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2007.

Rosen, L., Chappell., Lagueur, G. L., Wallace, G. D., Weinstein, P. P. Eosinophilic meningitis caused by a metastrongylid lungworm of rats. J. Amer. Med. Ass. v.179, n.8, p.620-24, fevereiro 1962.

Simberloff, D. How much information on population biology is needed to manage introduced species? *Conservation Biology*, v.17, n.1, p.83-92, fevereiro 2003.

Simião, M. S. & Fischer, M. L. Estimativa e inferências do método de controle do molusco exótico *Achatina fulica* Bowdich 1822 (Stylommatophora; Achatinidae) em Pontal do Paraná, litoral do Estado do Paraná. *Cad. Biodiv* .v.4 , n.2, p.74-82, dezembro 2004.

Simões R. O., Monteiro, F. A., Sánchez, E., Thiengo, S. C., Garcia, J. S., Costa-Neto, S. F., Maldonado, Jr. Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* v.17, n.7, p.1331-3, julho 2011.

Simone, L. R. L. Land and freshwater molluscs of Brazil. EGB, FAPESP. 390 p, 2006.

Sithithaworn, P., Brockelman ,W. Y, Brockelman, C. Transmission of *Angiostrongylus cantonensis* through the giant African snail *Achatina fulica*: an experimental study. *Southeast Asian J. Trop. Med. Health. Suppl.* 22, p.200-5, dezembro 1991.

Slom, T. J., Cortese, M. M., Gerber., S. I., Jones, R. C., Holtz, T. H. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. *New Engl. J. Med.* v.346, n.9, p.668–675, fevereiro 2002.

Teles, H. M. S., Vaz, J. F., Fontes, L. R., Domingos, M. D. Occurrence of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) in Brazil: intermediate snail host of Angiostrongyliasis. *Rev. Saúde Públ.* v.31, n.3, p.310-2, 1997.

Thiengo, S. C., Fernandez, M. A., Torres, E. J. L., Coelho, P. M., Lanfredi, R. M. First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina* (Lissachatina) *fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. *J. Invert. Pathol.* v.98, p.34-39, 2008.

Thiengo, S. C., Maldonado, A., Mota, E. M., Torres, E. J. L., Caldeira, R., Carvalho, O. S., Oliveira, A. P. M., Simões, R. O., Fernandez, M. A., Lanfredi, R.

M. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Tropica* v.115, p.194-199, 2010.

Thiengo, S. C., R. O., Faraco, A. F., Salgado, N. C., Cowie, R. H., Fernandez, M. A. Rapid spread of an invasive snail in South America the giant african snail, *Achatina fulica*, in Brasil. *Biol. Invas.* v. 9, p.693-702, 2007.

Tokiwa, T., Hashimoto,T., Yabe,T., Komatsu,N., kao, N., Ohta. N. First Report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) Infections in Invasive Rodents from Five Islands of the Ogasawara Archipelago, Japan. *Plos one*, v.8, n.8, p.1-5, agosto 2013.

Tsai, H. C., Chen, Y. S., Yen, C. M. Human parasitic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* infection in Taiwan. *Hawaii Journal of Medicine & Public Health*, v.72, p.26-27, 2013.

Tsai, H. C., Lee, S. S., Huang, C. K., Yen, C. M., Chen, E. R. Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.71, n.2, p.222–226, agosto 2004.

Tsai, H. C., Liu, Y. C., Kunin, C. M., Lee, S. S., Chen, Y. S, Lin, H. H, Tsai, T. H., W. R., Huang, C. K., Yen, M. Y., Yen, C. M. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. *Am. J. Med.* v.111, n.2, p.109-14, agosto 2001.

Ubelaker, J.E. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. *J. Parasit.* 72(2) 237-24, 1986.

Vasconcelos, M. C. & Szabó, R, B. Associação Brasileira de Controle de Vetores e Pragas – ABCVP. Vetores & Pragas. Caramujo Africano: Um caso de Saúde Pública. Ano VI, n. 14, Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 20-23, 2004.

Vasconcelos, M. C., Pile, E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Saú. Públ.* v.35, n.6, p.582-84, 2001.

Wallace, G. D. & Rosen. L. Studies on eosinophilic meningitis. Molluscan hosts of *Angiostrongylus cantonensis* on the Pacific islands. Am. J. Trop. Med. Hyg. v.18, n.2, p.206-16, 1969b.

Wallace, G. D. & Rosen. L. Techniques for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. Malacologia, v.7, p.427-39, 1969a.

Wang, Q. P., Lai, D. H., Zhu, X. Q., Chen, X. G., Lun, Z. R. Human angiostrongyliasis. The Lancet Infect. Dis. v.8, n.10, p.621-628, outubro 2008.

Weinstein, P. P., Rosen, L., Laqueur, G. L., Sawyer, T. K. *Angiostrongylus cantonensis* infection in rats and rhesus monkeys, and observations on the survival of the parasite in vitro. Am. J. Trop. Med. Hyg. v.12, n.3, p.358-77, maio 1963.

Wen, Y. F. Development of *Angiostrongylus cantonensis* in the lung of *Achatina fulica*. Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Xue Za Zhi, v.10, n.3, p.74-9, 1977.

Wilkins, P. P., Qvarnstrom, Y., Whelen, C. A. The current status of laboratory diagnosis of *Angiostrongylus cantonensis* infections in humans using serologic and molecular methods. Hawaii Journal of Medicine & Public Health, v.72, p.55-57, 2013.

Yang, T. B., Wu, Z. D., Lun, Z. R. The apple snail *Pomacea canaliculata*, a novel vector of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*: its introduction, spread, and control in China. Hawaii Journal of Medicine & Public Health, v.72, p.23-25, 2013.

Yen, C. M., Wang, J. J., Lee, J. D., Chen, Y. P., Chen, E. R. Parasitic infections among wild rats from two areas of Kaohsiung. Kaohsiung J. Med. Sci. v.12, n.3, p.145-9, 1996.

Yii, C. Y. Clinical observations on eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* on Taiwan. Am. J. Trop. Med. Hyg. v.25, n.2, p.233-49, março 1976.

APÊNDICE A

NÚMERO ABSOLUTO E TAMANHO MÉDIO (\pm DESVIO PADRÃO) DE
ADULTOS JOVENS E ADULTOS DE *Achatina fulica* ENCONTRADOS
DURANTE AS COLETAS

Tabela 1 - Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados no município de Praia Grande, São Paulo.

Bairros	Adultos jovens	Adultos	TOTAL	Tamanho médio (mm) \pm Desvio Padrão
Canto do Forte	1	5	6	88,80 \pm 1,62
Boqueirão	4	2	6	78,80 \pm 1,48
Aviação	1	5	6	78,80 \pm 0,88
Guilhermina	6	0	6	63,50 \pm 0,39
Caiçara	1	5	6	82,30 \pm 1,24
Cidade Ocian	3	3	6	76,50 \pm 0,94
Solemar	3	3	6	72,10 \pm 0,85
Jardim do Trevo	4	2	6	74,00 \pm 0,87
Jardim Quietude	0	6	6	86,30 \pm 0,84
Vila Antártica	3	3	6	71,80 \pm 0,35
TOTAL	26	34	60	

Tabela 2 - Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados no município de São Vicente, São Paulo.

Bairros	Adultos jovens	Adultos	TOTAL	Tamanho médio (mm) \pm Desvio Padrão
Parque Bitaru	1	5	6	76,50 \pm 0,81
Ilha Porchat	1	5	6	77,30 \pm 0,53
Guassu	1	5	6	78,10 \pm 1,19
Japuí	3	3	6	71,30 \pm 0,70
Biquinha	4	2	6	74,50 \pm 1,72
Rio Branco	3	3	6	71,80 \pm 0,67
Samaritá	4	2	6	68,30 \pm 0,71
Jockey	3	3	6	72,00 \pm 0,49
Humaitá	1	5	6	72,10 \pm 0,72
Parque das Bandeiras	3	3	6	77,60 \pm 1,86
TOTAL	24	36	60	

Tabela 3 - Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados no município de Santos, São Paulo.

Bairros	Adultos jovens	Adultos	TOTAL	Tamanho médio (mm) \pm Desvio Padrão
Valongo	5	1	6	68,00 \pm 0,76
Nova Cintra	0	6	6	91,80 \pm 0,85
Bom Retiro	2	4	6	71,50 \pm 0,81
Marapé	1	5	6	72,80 \pm 0,30
Macuco	1	5	6	75,30 \pm 0,70
Pompéia	4	2	6	65,30 \pm 0,80
Ponta da Praia	0	6	6	80,60 \pm 0,96
Encruzilhada	0	6	6	88,50 \pm 0,65
Paquetá	2	4	6	71,80 \pm 0,69
Vila São Jorge	1	5	6	75,00 \pm 0,60
TOTAL	16	44	60	

Tabela 4 - Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados no município de Cubatão, São Paulo.

Bairros	Adultos jovens	Adultos	TOTAL	Tamanho médio (mm) \pm Desvio Padrão
Parque São Luiz	2	4	6	75,50 \pm 1,19
Vila Couto	3	3	6	72,00 \pm 0,94
Costa e Silva	0	6	6	105,00 \pm 1,25
Jardim Casqueiro	0	6	6	79,60 \pm 0,41
Vila Nova	1	5	6	79,80 \pm 0,67
Nova República	3	3	6	75,30 \pm 1,57
Vila São José	2	4	6	74,30 \pm 2,70
Parque Fernando Jorge	1	5	6	76,00 \pm 0,37
Vila Elizabeth	2	4	6	77,60 \pm 1,39
Vale Verde	2	4	6	72,00 \pm 1,26
TOTAL	16	44	60	

Tabela 5 - Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados no município de Mongaguá, São Paulo.

Bairros	Adultos jovens	Adultos	TOTAL	Tamanho médio (mm) \pm Desvio Padrão
Pedreira	2	4	6	73,80 \pm 0,74
Vera Cruz	0	6	6	82,50 \pm 0,73
Vila Atlântica	0	6	6	84,60 \pm 0,67
Eugênia	0	6	6	78,50 \pm 0,33
Agenor de Campos	5	1	6	67,30 \pm 0,88
Flórida Mirim	2	4	6	81,60 \pm 2,06
Parque Marinho	0	6	6	76,50 \pm 0,50
Centro	0	6	6	78,60 \pm 0,68
Vila Anhanguera	1	5	6	79,10 \pm 0,90
Jussara	1	5	6	74,30 \pm 0,39
TOTAL	11	49	60	

Tabela 6 - Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados no município de Itanhaém, São Paulo.

Bairros	Adultos jovens	Adultos	TOTAL	Tamanho médio (mm) \pm Desvio Padrão
Loty	1	5	6	72,10 \pm 0,60
Suarão	5	1	6	67,10 \pm 0,82
Anchieta	0	6	6	76,10 \pm 0,63
Centro	0	6	6	92,10 \pm 0,60
Belas Artes	0	6	6	76,10 \pm 0,40
Umuarama	5	1	6	64,10 \pm 0,89
Guacyra	6	0	6	57,50 \pm 0,49
Balneário Tupi	3	3	6	69,60 \pm 0,70
Cibratel	3	3	6	70,80 \pm 0,88
Gaivota	0	6	6	88,80 \pm 0,43
TOTAL	23	37	60	

Tabela 7 - Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados no município de Peruíbe, São Paulo.

Bairros	Adultos jovens	Adultos	TOTAL	Tamanho médio (mm) \pm Desvio Padrão
Caraguava	2	4	6	80,30 \pm 0,60
Jardim Valéria	6	0	6	62,20 \pm 0,82
Erminda	0	6	6	75,10 \pm 0,63
Jardim Icaraíba	5	1	6	67,50 \pm 0,60
Parque Balneário Óasis	1	5	6	75,80 \pm 0,40
Balneário São João Batista I	2	4	6	78,10 \pm 0,89
Centro	0	6	6	78,00 \pm 0,49
Cidade Balneário Peruíbe	0	6	6	86,30 \pm 0,70
Balneário São João Batista	3	3	6	74,00 \pm 0,88
América	0	6	6	87,80 \pm 0,43
TOTAL	19	41	60	

Tabela 8 - Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados no município de Guarujá, São Paulo.

Bairros	Adultos jovens	Adultos	TOTAL	Tamanho médio (mm) \pm Desvio Padrão
Vila Lygia	3	3	6	71,30 \pm 0,60
Guaiuba	4	2	6	66,80 \pm 0,82
Centro	0	6	6	92,30 \pm 0,63
Cidade Atlântica	0	6	6	89,30 \pm 0,60
Jardim Virgínia I	2	4	6	74,80 \pm 0,40
Pernambuco	4	2	6	70,30 \pm 0,89
Perequê	3	3	6	73,50 \pm 0,49
Jardim	0	6	6	88,80 \pm 0,70
Conceiçãozinha	0	6	6	90,30 \pm 0,88
Santa Rosa	0	6	6	90,30 \pm 0,88
Paicará	3	3	6	70,00 \pm 0,43
TOTAL	19	41	60	

Tabela 9 - Número absoluto e tamanho médio (\pm desvio padrão) de adultos jovens e adultos de *Achatina fulica* coletados no município de Bertioga, São Paulo.

Bairros	Adultos jovens	Adultos	TOTAL	Tamanho médio (mm) \pm Desvio Padrão
Santa Cruz	1	5	6	77,60 \pm 0,60
Albatroz I	2	4	6	77,10 \pm 0,82
Vila Ho	0	6	6	83,10 \pm 0,63
Jardim Canções	4	2	6	69,50 \pm 0,60
São Rafael	4	2	6	74,00 \pm 0,40
Indaiá	3	3	6	83,60 \pm 0,89
Jardim São Lourenço	1	5	6	72,00 \pm 0,49
Boracéia	2	4	6	82,30 \pm 0,70
Chácara Itaponhau	0	6	6	79,30 \pm 0,88
Jardim Paulista	2	4	6	77,10 \pm 0,43
TOTAL	19	41	60	

APÊNDICE B

NÚMERO DE LARVAS DE NEMATÓIDES OBSERVADAS EM *Achatina fulica*,
NOS NOVE MUNICÍPIOS DA BAIXADA SANTISTA.

Tabela 10 - Número de larvas de nematóides observadas em *Achatina fulica* no município de Praia Grande, São Paulo.

Pontos de coleta (bairros)	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados	Nº total de larvas de nematoides	Média por molusco
Canto do Forte	6	1	1	0,20
Boqueirão	6	5	1867	311,16
Aviação	6	3	1185	237,00
Guilhermina*	6	3	390	65,00
Caiçara	6	2	97	16,10
Cidade Ociam	6	4	503	83,80
Solemar	6	3	1790	298,30
Jardim do Trevo	6	5	119	19,80
Jardim Quietude	6	1	4	0,60
Vila Antártica	6	3	143	28,6
TOTAL	60	30	6099	

(*) Indica terreno particular com culturas diversas.

Tabela 11 - Número de larvas de nematóides observadas em *Achatina fulica* no município de São Vicente, São Paulo.

Pontos de coleta (bairros)	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados	Nº total de larvas de nematoides	Média por molusco
Guassu	6	0	0	0,00
Ilha Porchat	6	1	1	0,16
Japuí	6	0	0	0,00
Parque Bitaru	6	2	14	2,30
Biquinha	6	2	81	13,50
Rio Branco	6	5	3220	536,60
Samaritá	6	1	11	1,83
Jockey Club	6	4	76	12,60
Humaitá	6	2	6	1,00
Pq das Bandeiras	6	3	131	21,80
TOTAL	60	20	3540	

Tabela 12 - Número de larvas de nematóides observadas em *Achatina fulica* no município de Santos, São Paulo.

Pontos de coleta (bairros)	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados	Nº total de larvas de nematoides	Média por molusco
Valongo	6	2	11	1,83
Nova Cintra	6	0	0	00,00
Bom Retiro	6	1	632	105,50
Marapé	6	1	6	1,00
Macuco	6	1	1328	221,30
Pompéia	6	0	0	00,00
Ponta da Praia	6	6	1675	296,33
Encruzilhada	6	3	287	47,80
Paquetá	6	0	0	00,00
Vila São Jorge	6	2	6	1,00
TOTAL	60	16	3945	

Tabela 13 - Número de larvas de nematóides observadas em *Achatina fulica* no município de Cubatão, São Paulo.

Pontos de coleta (bairros)	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados	Nº total de larvas de nematoides	Média por molusco
Parque São Luiz	6	4	138	23,00
Vila Couto	6	0	0	00,00
Costa e Silva	6	0	0	00,00
Jardim Casqueiro	6	1	17	2,83
Vila Nova	6	0	0	00,00
Nova República	6	2	10	1,60
Vila São José	6	1	53	8,80
Pq Fernando Jorge	6	1	25	4,16
Vila Elizabeth	6	2	149	24,80
Vale Verde	6	5	61	10,10
TOTAL	60	16	453	

Tabela 14 - Número de larvas de nematóides observadas em *Achatina fulica* no município de Mongaguá, São Paulo.

Pontos de coleta (bairros)	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados	Nº total de larvas de nematoides	Média por molusco
Pedreira	6	1	3	0,50
Vera Cruz	6	2	471	78,50
Vila Atlântica	6	5	425	70,80
Eugênia	6	4	6	1,00
Agenor de Campos	6	5	331	55,10
Flórida Mirim	6	1	349	58,10
Parque Marinho	6	0	0	00,00
Centro	6	1	7	1,16
Vila Anhanguera	6	3	3213	539,16
Jussara	6	3	1070	203,6
TOTAL	60	25	5875	

Tabela 15 - Número de larvas de nematóides observadas em *Achatina fulica* no de Itanhaém, São Paulo.

Pontos de coleta (bairros)	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados	Nº total de larvas de nematoides	Média por molusco
Loty	6	4	731	121,80
Suarão	6	6	35	5,80
Anchieta	6	3	129	21,50
Centro	6	1	5	0,80
Belas Artes	6	4	160	26,60
Umuarama	6	2	227	37,80
Guacyra	6	1	5	0,80
Balneário Tupi	6	3	137	22,80
Cibratel I	6	4	4347	72,50
Gaivota	6	0	0	00,00
TOTAL	60	28	5776	

Tabela 16 - Número de larvas de nematóides observadas em *Achatina fulica* no município de Peruíbe, São Paulo.

Pontos de coleta (bairros)	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados	Nº total de larvas de nematoides	Média por molusco
Caraguava	6	0	0	00,00
Jardim Valéria	6	2	17	2,80
Erminda	6	4	2113	352,16
Jardim Icaraíba	6	0	0	00,00
Pq Balneário Oásis	6	4	4538	756,30
Balneário São João Batista I	6	6	5173	862,16
Centro	6	3	68	11,30
Cidade Balneário Peruíbe	6	4	397	66,16
Balneário São João Batista	6	6	1771	295,16
América	6	5	2755	459,16
TOTAL	60	34	16832	

Tabela 17 - Número de larvas de nematóides observadas em *Achatina fulica* no município de Guarujá, São Paulo.

Pontos de coleta (bairros)	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados	Nº total de larvas de nematoides	Média por molusco
Vila Lygia	6	2	532	88,60
Guaiuba	6	0	0	00,00
Centro	6	0	0	00,00
Cidade Atlântica	6	2	3	0,50
Jardim Virgínia I	6	1	1	0,16
Pernambuco	6	2	12	2,00
Perequê	6	4	2004	334
Jardim Conceiçãozinha	6	3	3297	549,50
Santa Rosa	6	0	0	00,00
Paicará	6	0	0	00,00
TOTAL	60	14	5849	

Tabela 18 - Número de larvas de nematóides observadas em *Achatina fulica* no município de Bertioga, São Paulo.

Pontos de coleta (bairros)	Nº de moluscos coletados	Nº de moluscos infectados	Nº total de larvas de nematoides	Média por molusco
Santa Cruz	6	0	0	00,00
Albatroz I	6	3	151	25,16
Vila Ho	6	2	2	0,33
Jardim Canções	6	4	162	27,00
São Rafael	6	2	291	48,50
Indaiá	6	2	9724	1620
Jardim São Lourenço	6	1	1	0,16
Boracéia	6	1	4	0,66
Chácara Itaponhau	6	2	103	17,10
Jardim Paulista	6	4	225	37,50
TOTAL	60	21	10663	

APÊNDICE C

CARACTERÍSTICAS SANITÁRIAS E GEOLOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE
COLETA DE *Achatina fulica*
NOS NOVE MUNICÍPIOS DA BAIXADA SANTISTA.

Tabela 19 – Características sanitárias e localização dos pontos de coleta de *Achatina fulica* no município de Praia Grande-SP.

Bairros	Características do local	Localização (GPS)		T °C
		Latitude Sul (S)	Longitude Oeste (W)	
Canto do Forte	Terreno cercado, sem a presença de lixo, mas com um pouco de entulho e pés-de-bananeira.	24° 00' 30"	46° 23' 42"	28
Boqueirão	Terreno baldio com muito lixo doméstico, entulhos, colchões, tapetes.	24° 00' 09"	46° 24' 52"	28,2
Aviação	Terreno grande e aberto com muito entulho e lixo doméstico. Chama a atenção os restos de espigas de milho.	24° 00' 47"	46° 26' 08"	28
Guilhermina	Propriedade particular cultivada (chuchu, mandioca, laranja e bananeira). Os moluscos coletados eram pequenos, pois o terreno é constantemente limpo; o proprietário relatou a presença de ratos no local.	24° 00' 42"	46° 25' 57"	27,2
Caiçara	Terreno baldio com pouco lixo doméstico e orgânico.	24° 02' 21"	46° 30' 45"	28
Cidade Ocian	Terreno baldio, com muito lixo doméstico, entulho e vegetação baixa.	24° 01' 24"	46° 28' 46"	29
Solemar	Terreno baldio com pouco entulho e lixo doméstico.	24° 04' 53"	46° 35' 33"	31
Jardim do Trevo	Terreno baldio com vegetação alta, muito entulho, e pouco lixo orgânico.	24° 01' 59"	46° 31' 16"	28
Jardim Quietude	Terreno baldio com muito entulho e muito lixo orgânico.	24° 00' 53"	46° 28' 50"	29
Vila Antártica	Terreno baldio com muito entulho e muito lixo orgânico.	23° 59' 56"	46° 27' 00"	30

Tabela 20 – Características sanitárias e localização dos pontos de coleta de *Achatina fulica* no município de São Vicente-SP.

Bairros	Características do local	Localização (GPS)		T °C
		Latitude Sul (S)	Longitude Oeste (W)	
Parque Bitaru	Área externa da Unesp, com um pouco de entulho.	23° 58' 17"	46° 23' 39"	26
Ilha Porchat	Morro, bordas perto do muro, com um pouco de lixo e entulho	23° 58' 47"	46° 22' 12"	28
Jardim Guassu	Terreno baldio com pouco lixo e sem entulho.	23° 57' 04"	46° 23' 35"	27
Japui	Quintal da casa com criação de galinhas em torno de bananeiras - muitas fezes de <i>A. fulica</i> nas bananeiras - e pilhas de madeira velha. O que chamou a atenção foi que nenhum molusco foi encontrado no chão, todos foram coletados sob as madeiras e em cima das bananeiras.	23° 59' 13"	46° 25' 57"	25
Biquinha	Terreno aberto no Morro dos Barbosas, com pouco lixo e restos de vegetação.	23° 58' 21"	46° 23' 14"	28
Rio Branco	Quintal de casa com muito lixo doméstico, restos de comida, fraldas descartáveis usadas, com grande infestação de moluscos no chão e nas paredes.	23° 58' 51"	46° 27' 26"	29,5
Samaritá	Terreno baldio com pouco lixo e entulho e com muita vegetação arbustiva e rasteira. Grande quantidade de moluscos pequenos	23° 59' 27"	46° 28' 25"	28
Jóquei Clube	Terreno baldio com muito lixo e entulho, mas pouco lixo orgânico	23° 56' 33"	46° 23' 35"	31
Humaitá	Terreno baldio, com entulho e pouco lixo orgânico.	23° 57' 09"	46° 27' 01"	26,5
Parque das Bandeiras	Terreno baldio com pouco lixo orgânico, porém com entulho, colchões, sofá.	23° 58' 38"	46° 29' 39"	28

Tabela 21 – Características sanitárias e localização dos pontos de coleta de *Achatina fulica* no município de Santos-SP.

Bairros	Características do local	Localização (GPS)		T °C
		Latitude Sul (S)	Longitude Oeste (W)	
Valongo	Área externa de uma policlínica, sem entulho, com plantas ornamentais e pouco mato.	23° 55' 49"	46° 20' 30"	26,5
Morro Nova Cintra	Terreno particular no alto do morro, muito íngreme e com lixo doméstico. Várias construções abandonadas e cheias de entulhos, madeiras podres e plantas.	23° 56' 28"	46° 21' 37"	28
Bom Retiro	Terreno grande e baldio, com antena de telefonia, pouco lixo doméstico. Presença de cavalos com muito alimento e estrume. Relatos de diminuição em 50% dos moluscos a presença de ratos e carrapatos.	23° 56' 09"	46° 22' 49"	28
Marapé	Terreno fechado sem morador, com grama alta, sem lixo doméstico e com pouco entulho antigo nos cantos.	23° 56' 51"	46° 20' 33"	26
Macuco	Terreno ao longo de linha desativada de trem, próximo a muro alto, úmido, com vegetação rasteira, sem lixo e sem entulho.	23° 57' 28"	46° 19' 10"	25
Pompéia	Todos os moluscos foram coletados em um tronco de árvore na calçada, em frente a um terreno vazio, cercado e com vegetação baixa (capim), sem entulho e sem lixo doméstico.	23° 57' 51"	46° 20' 42"	25
Ponta da Praia	Terreno grande com muitas árvores de porte, bastante úmido, com muito entulho, lixo e restos orgânicos. Altamente infestados por <i>A. fulica</i> e <i>B. similis</i> .	23° 58' 55"	46° 17' 40"	23
Encruzilhada	Terreno grande, oriundo de demolição de casario, com plantas trepadeiras e pouco entulho e pouco lixo orgânico.	23° 57' 02"	46° 19' 26"	23
Paquetá	Moluscos coletados junto às plantas ornamentais e túmulos do Cemitério Paquetá.	23° 56' 18"	46° 19' 05"	24
Vila São Jorge	Jardim de um condomínio fechado, com sobrados de classe média baixa. Local limpo, porém com capim alto próximo aos muros e muito úmido.	23° 58' 49"	46° 21' 54"	24

Tabela 22 – Características sanitárias e localização dos pontos de coleta de *Achatina fulica* no município de Cubatão-SP.

Bairros	Características do local	Localização (GPS)		T °C
		Latitude Sul (S)	Longitude Oeste (W)	
Parque São Luis	Terreno baldio, com capim alto e sem lixo doméstico.	23° 55' 28"	46° 24' 58"	28
Vila Couto	Final de rua sem saída, sem lixo e sem entulho, bem sombreado por árvores e muito úmido e fresco. Após o muro, passa a linha de trem.	23° 53' 09"	46° 25' 42"	26
Vila Costa e Silva	Margem esquerda do Rio Cubatão, onde a população tem horta e joga algum lixo. Há madeiras empilhadas e pedaços de concreto de pontes abandonadas.	23° 52' 29"	46° 24' 56"	29
Jardim Casqueiro	Terreno baldio com mato alto, sem lixo doméstico, muito seco e com entulho antigo. Muitas conchas vazias.	23° 55' 45"	46° 24' 32"	25
Vila Nova	Terreno baldio, úmido, sem lixo orgânico, mas com muito entulho, vegetação baixa e muitos moluscos pequenos.	23° 54' 01"	46° 25' 38"	27
Vila Nova República	Mata ciliar ao longo de um córrego e margeando rua habitada, com entulho e lixo orgânico.	23° 55' 12"	46° 25' 46"	24
Vila São José	Mata ciliar ao longo de um córrego e da Rodovia Padre Anchieta, margeando rua habitada, muito úmido, com entulho e pouco lixo orgânico.	23° 54' 27"	46° 25' 28"	24
Parque Fernando Jorge	Terreno baldio, com mata arbustiva, bastante entulho e pouco lixo orgânico. Havia um cavalo preso no local que lhe serve de pasto.	23° 52' 46"	46° 24' 51"	27
Vila Elizabeth	Terreno limpo, com vegetação alta em alguns pontos, com troncos úmidos, sendo que uma parte é quintal de casario.	23° 52' 32"	46° 25' 19"	28
Vale Verde	Terreno baldio limpo, com pouco de capim, madeira empilhada em um lado onde foram encontrados os moluscos.	23° 54' 46"	46° 27' 54"	27

Tabela 23 – Características sanitárias e localização dos pontos de coleta de *Achatina fulica* no município de Mongaguá-SP.

Bairros	Características do local	Localização (GPS)		T °C
		Latitude Sul (S)	Longitude Oeste (W)	
Pedreira	Terreno grande, com entulho e sem lixo orgânico.	24° 05' 49"	46° 38' 77"	23
Vera Cruz	Terreno baldio, com árvores grandes, bananeiras, com madeira e lixo orgânico.	23° 05' 55"	46° 38' 26"	23
Vila Atlântica	Terreno grande e limpo, com vegetação alta.	24° 06' 23"	46° 39' 04"	22
Jardim Eugênia	Terreno baldio muito úmido, sem lixo e com vegetação característica de charco.	24° 06' 52"	46° 40' 07"	22
Agenor de Campos	Terreno baldio, alagado, com pouco entulho, recém-queimado, com muitos moluscos mortos e vegetação média.	24° 07' 26"	46° 41' 71"	24
Flórida Mirim	Terreno baldio aberto, com vegetação alta e característica de alagadiço, com entulho antigo e pouco lixo orgânico.	24° 08' 08"	46° 42' 42"	28
Parque Marinho	Terreno fechado e limpo, com bastante entulho antigo na beira do muro e com vegetação baixa.	24° 08' 13"	46° 42' 02"	29
Centro	Terreno grande, baldio, com capim alto e com pouco entulho.	24° 05' 33"	46° 36' 57"	27
Vila Anhanguera	Terreno baldio fechado com vegetação alta, muito entulho na borda do muro e com lixo orgânico.	24° 06' 38"	46° 39' 01"	28
Jardim Jussara	Terreno grande com pouco entulho, capim alto, sem lixo orgânico.	24° 47' 26"	46° 40' 40"	29

Tabela 24 – Características sanitárias e localização dos pontos de coleta de *Achatina fulica* no município de Itanhaém-SP.

Bairros	Características do local	Localização (GPS)		T °C
		Latitude Sul (S)	Longitude Oeste (W)	
Loty	Terreno baldio com bastante entulho e fezes de cavalo.	24° 08' 30"	46° 42' 59"	24
Suarão	Terreno com vegetação alta, com um pouco de entulho e construção abandonada no fundo.	24° 09' 38"	46° 45' 07"	25
Anchieta	Terreno baldio grande, com pouco entulho. Uma parte foi queimada.	24° 10' 28"	46° 47' 03"	26
Centro	Terreno baldio fechado, com capim alto e com muito entulho beirando o lado interno do muro.	24° 11' 13"	46° 47' 40"	26
Belas Artes	Terreno particular úmido e sombreado com árvores, com pouco entulho, construção parada.	24° 11' 12"	46° 48' 32"	23
Umuarama	Terreno baldio, com capim alto, sem entulho, sem lixo orgânico e madeiras em decomposição.	24° 10' 53"	46° 49' 12"	23
Guacyra	Terreno limpo com charco ao fundo	24° 12' 19"	46° 52' 12"	24
Balneário Tupi	Terreno baldio, sem lixo orgânico e pouco lixo doméstico.	24° 12' 37"	46° 50' 45"	25
Cibratel I	Terreno baldio com um pouco de entulho e um pouco de lixo orgânico e vegetação alta.	24° 12' 06"	46° 49' 17"	25
Gaivotas	Terreno baldio entre duas casas e aberto na frente, com capim alto, pouco entulho, pouco lixo orgânico e alagado no fundo.	24° 14' --"	46° 50' --"	24

Tabela 25 – Características sanitárias e localização dos pontos de coleta de *Achatina fulica* no município de Peruíbe-SP.

Bairros	Características do local	Localização (GPS)		T °C
		Latitude Sul (S)	Longitude Oeste (W)	
Caraguava	Terro baldio com pouco lixo doméstico e entulho, com capim alto.	24° 17' 48"	47° 14' 42"	28
Jardim Valéria	Terreno baldio com muito entulho e vegetação alta, com pouco lixo orgânico.	23° 18' 56"	47° 00' 33"	28
Erminda	Terreno baldio recém-queimado, com muito entulho, um pouco de lixo doméstico, com árvores no local.	24° 15' 48"	46° 57' 35"	25
Jardim Icaraíba	Terreno baldio, vegetação alta e capim, um pouco de lixo doméstico, sem entulho e com restos de folhagem seca.	24° 16' 39"	46° 56' 42"	23
Parque Balneário Oásis	Terreno baldio murado com vegetação alta, pouco lixo orgânico, com calçada cheia de capim. Todos os moluscos foram coletados na calçada.	24° 17' 20"	46° 58' 12"	23
Balneário São João Batista I	Terreno baldio recém-queimado, com muito entulho, um pouco de lixo doméstico e entulho e bananeiras no local.	24° 18' 09"	46° 59' 18"	23
Centro	Terreno baldio com muito entulho e lixo orgânico, restos de vegetação. Havia muitos moluscos no local.	24° 19' 09"	47° 00' 06"	23
Cidade Balneário Peruíbe	Terreno fechado e murado com vegetação alta, pouco lixo orgânico e lixo doméstico, com pouco de entulho nas bordas frontais do terreno.	24° 19' 41"	47° 00' 13"	23
Balneário São João Batista	Terreno em frente ao mar, aberto, com um pouco de entulho e lixo. Muito lixo orgânico e restos de vegetação.	24° 18' 44"	46° 58' 57"	23
Jardim América	Terreno grande, murado em frente ao mar, com entulho, mato alto, árvores e muito capim. Moluscos capturados na calçada.	24° 17' 15"	46° 57' 12"	24,5

Tabela 26 – Características sanitárias e localização dos pontos de coleta de *Achatina fulica* no município de Guarujá-SP.

Bairros	Características do local	Localização (GPS)		T °C
		Latitude Sul (S)	Longitude Oeste (W)	
Vila Lygia	Borda de muro (calçada), com restos de peixes, pequena quantidade de lixo e entulho, sem moradia ao redor.	23° 59' 42"	46° 17' 29"	20
Gauaiuba	Coleta feita na calçada em torno de muros e em vegetação de canteiros. Local limpo.	24° 00' 47"	46° 16' 58"	22
Centro	Terreno baldio, com um monte de lixo orgânico próximo à entrada e limpo nas outras partes; apenas um pouco de entulho antigo espalhado.	23° 59' 32"	46° 15' 16"	22
Cidade Atlântica	Terreno baldio úmido com muitas fezes humanas espalhadas, bastante entulho de construção demolida, vegetação baixa com árvores grandes, sem lixo doméstico e com pouco lixo orgânico.	23° 58' 35"	46° 13' 26"	24
Jardim Virginia I	Moluscos coletados na calçada, com capim alto e sem qualquer tipo de lixo.	23° 58' 45"	46° 13' 01"	24
Pernambuco	Terreno baldio, alagadiço e sem lixo; com mato alto.	23° 58' 12"	46° 11' 16"	22
Perequê	Terreno baldio com muito lixo orgânico, bastante entulho e muitos sacos de cimento vazios.	23° 56' 25"	46° 10' 48"	25
Jardim Conceiçãozinha	Terreno baldio com vegetação alta e várias bananeiras e um pouco de entulho.	23° 56' 33"	46° 23' 35"	18
Santa Rosa	Terreno baldio com entulho e um pouco de lixo doméstico, lixo orgânico e capim alto.	23° 59' 11"	46° 16' 11"	18
Paecara	Terreno público, com linha de transmissão de energia elétrica, capim baixo, muito lixo orgânico (milho e frutos de <i>Terminalia catappa</i> – conhecidos na região como cuca).	23° 56' 59"	46° 18' 09"	20

Tabela 27 – Características sanitárias e localização dos pontos de coleta de *Achatina fulica* no município de Bertioga-SP.

Bairros	Características do local	Localização (GPS)		T °C
		Latitude Sul (S)	Longitude Oeste (W)	
Santa Cruz	Terreno baldio, sem lixo e serve como depósito de postes de cimento.	23° 51' 40"	46° 08' 24"	22
Albatroz I	Calçada de uma casa de esquina, sem lixo, com vegetação alta e algum entulho beirando o muro.	23° 49' 59"	46° 08' 07"	24
Vila Ho	Quintal de casa sem muro, nenhum lixo orgânico, com capim e um pouco de vegetação alta nos fundos.	23° 49' 43"	46° 07' 21"	21
Jardim Cancões	Terreno baldio, arenoso em um lado e alagadiço em outro; sem lixo, com pouco de entulho.	23° 48' 57"	46° 04' 45"	23
São Rafael	Terreno de esquina, vegetação alta e fechada, alagadiço, com entulho e lixo orgânico. Vala de esgoto ao redor.	23° 49' 07"	46° 05' 43"	19
Indaiá	Terreno baldio com bastante lixo orgânico, folhas, capins e vegetação de alagado ao fundo, com entulho.	23° 48' 24"	46° 03' 40"	21
Jardim São Lourenço	Terreno baldio com vegetação alta e um pouco de entulho.	23° 56' 59"	46° 00' 19"	22
Boraceia	Terreno baldio com lixo orgânico e doméstico, capim alto e muitas conchas vazias. Relato de "garças pretas" se alimentando dos <i>A. fulica</i> .	23° 45' 21"	45° 51' 30"	22
Chácara Itaponhau	Terreno baldio com muito lixo orgânico e um pouco de entulho, algumas árvores e vegetação alta.	23° 48' 33"	46° 04' 16"	22
Jardim Paulista	Terreno baldio com vegetação alta, algumas árvores, entulho antigo e lixo orgânico.	24° 50' 30"	47° 07' 47"	24