



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Patrícia Hercília Arcanjo de Almeida

**Avaliação da presença de *Achatina fulica* Bowdich, 1822
(Gastropoda: Pulmonata) em Feira de Santana, Bahia, e estudo de
parasitos associados**

Feira de Santana

Março de 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Patrícia Hercília Arcanjo de Almeida

**Avaliação da presença de *Achatina fulica* Bowdich, 1822
(Gastropoda: Pulmonata) em Feira de Santana, Bahia, e estudo de
parasitos associados**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Aristeu Vieira Da Silva

Feira de Santana

Março de 2014

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

A45a Almeida, Patrícia Hercília Arcanjo de
Avaliação da presença de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Gastropoda: Pulmonata) em Feira de Santana, Bahia, e estudo de parasitos associados / Patrícia Hercília Arcanjo de Almeida. – Feira de Santana, 2014.
113 f. : il.

Orientador: Aristeu Vieira Da Silva.

Mestrado (dissertação) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, 2014.

1. *Achatina fulica* Bowdich – Feira de Santana. 2. Caramujos. I. Silva, Aristeu Vieira Da, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

PATRÍCIA HERCÍLIA ARCANJO DE ALMEIDA

**Avaliação da presença de *Achatina fulica* Bowdich, 1822
(Gastropoda: Pulmonata) em Feira de Santana, Bahia, e estudo de
parasitos associados.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Zoologia da Universidade Estadual
de Feira de Santana.

Aprovado em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva (ORIENTADOR)

Prof. Dr. George Rego do Albuquerque (UESC)

Profa. Dra. Mariana Borges Botura (UEFS)

Feira de Santana

Março de 2014

*Aos meus pais Tania e Paulo e a minha
irmã Fernanda pelo amor, apoio e
incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos são especialmente orientados...

À Deus, luz e motivação de todos os meus passos e caminhos.

Ao meu orientador, Aristeu Vieira da Silva, pelo amparo e constante empenho no trabalho. Por compreender minhas limitações, necessidades e anseios e pelo incentivo, paciência no decorrer desses dois anos.

À minha amiga e colega de mestrado Sofia Aline, pela paciência, por compartilhar momentos de estudos, de coleta de campo, de processamento de amostras no laboratório e ainda, pelos momentos de união, companheirismo, convivência harmoniosa, dicas, conselhos e pelos bons momentos que passamos durante esses dois que jamais esquecerei.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, por permitir a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, pela oportunidade de realizar o meu mestrado.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Zoologia pelos ensinamentos durante o curso.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Agripino e Mara, pelo grande apoio e atenção dedicados aos alunos do mestrado.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia (LABIO), pelo apoio e incentivo no decorrer desde trabalho.

À Dra. Silvana Thiengo do Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica (LRNMM- FIOCRUZ-RJ) pelo treinamento para identificação de nematódeos de interesse médico-veterinário.

Ao Dr. Carlos Graeff-Teixeira e à Alessandra Morassutti do Laboratório de Parasitologia Molecular e Biologia Parasitária da PUC-RS, por cederem a cepa *Angiostrongylus cantonensis*.

Ao Dr. Luiz Fernando Pinta Gondim e ao doutorando Müller Ribeiro Andrade, do Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais da UFBA-BA, pelas cepas de *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona*.

Ao Dr. Rodrigo Costa da Silva e Dr. Helio Langoni, do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado às Zoonoses da UNESP/Botucatu-SP, pela padronização do protocolo de extração de DNA em fezes e pela cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias da USP-SP, pelas amostras de fezes de cães com *Cryptosporidium canis*.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM-UEFS) pelo suporte físico.

Ao Laboratório de Entomologia (LENT-UEFS), em especial ao Professor Eddy pelo suporte físico e auxílio nas etapas envolvendo às técnicas de biologia molecular e aos estagiários Neto e Matheus por toda disposição em nos emprestar o laboratório durante o trabalho e pela dicas de PCRs.

Ao Laboratório de Micologia (LAMIC-UEFS), pelo fornecimento do microscópio com a máquina fotográfica acoplada para a captura das imagens das larvas de nematódeo, desde já agradeço o apoio de todos!

As funcionárias em especial, Joelande, Selma, Aline, Luciara, Patrícia, Alane, Cíntia e as estagiárias em especial, Maiara, Milena e Marianne do laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia da UEFS (LAC-UEFS).

Ao meu amigo Jefferson, pela amizade e auxílio em determinados procedimentos laboratoriais e pelas discussões sobre as larvas de nematódeos.

Ao meu colega Mazinho, pela confecção dos mapas.

Aos bolsistas de Iniciação Científica do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública (Luana, Jadson, Priscylla e Kathleen) pela ajuda e apoio para manter os animais no laboratório.

À Maria Auxiliadora e Gorete, pelo grande apoio, por todos os conselhos, e pelo grande carinho e atenção dedicados a mim durante essa pesquisa.

À Ludmila, Dona Vilma e Linda, pela colaboração, durante a coleta dos exemplares em suas propriedades. Desde já agradeço o carinho e ajuda de vocês.

À minha amiga Tallane Teque, por me receber no Rio de Janeiro, facilitando a minha estadia durante o meu estágio na FIOCRUZ- RJ.

À minha amiga Lidiane Lisboa, pelas palavras de incentivo e momentos de descontração.

Aos meus amigos de mestrado, Renata Lee, Thalles e Laila, pela amizade, pelas reuniões e bons momentos que passamos durante o curso, que ficarão na lembrança.

Finalmente, aos amores da minha vida: a minha mãe Tania Arcanjo e meu pai Paulo Henrique, pelo apoio completo e incondicional. Tudo que me ensinaram contribui para que eu chegasse até aqui e eu espero poder retribuir tudo que vocês sempre fizeram e fazem por mim. AMO VOCÊS!!!

Às minhas irmãs Fernanda e Anita, que nos momentos mais difíceis sempre ressaltavam que acreditavam no meu potencial. Ser vista como exemplo por elas é um grande orgulho e não há palavras que definam o apoio e o amor recebido.

Aos meus familiares, em especial meus avôs Egmeia e Carranca e meus primos Murilo e Neto, que sempre torceram, vibraram e rezaram muito por mim.

E não vai demorar que passemos adiante (...) o alto escopo de uma grande ciência, de uma grande e bela ciência, que faz arte na defesa da vida. Carlos Chagas, 1928.

RESUMO

O caramujo africano *Achatina fulica* Bowdich, 1822, é uma espécie invasora que causa prejuízos ambientais, econômicos e a saúde humana e animal. O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência e os aspectos parasitários de *Achatina fulica* no município de Feira de Santana (BA). Para avaliação da ocorrência de *A. fulica* foram feitas coletas de janeiro a junho de 2013 em quatro pontos no perímetro urbano do município. No laboratório os animais foram mensurados quanto ao comprimento total da concha e a massa total. A partir desses dados o grau de desenvolvimento da população foi estimado, as relações entre as variáveis morfométricas e climáticas e o fator de condição foram calculados. Durante esse período foram coletados 600 caramujos apresentando comprimento predominante no intervalo de 47,6-57,0mm. Os resultados permitiram inferir que a população de *A. fulica* nos pontos de coleta estudados está em declínio, já que nessas áreas foram encontrados animais juvenis e jovens. Não houve associação entre as variáveis climáticas e morfométricas. A relação entre o comprimento total e a massa corporal mostrou que *A. fulica* apresentou um crescimento alométrico negativo. O fator de condição apresentou variações pontuais ao longo dos seis meses de coleta. A fim de avaliar os aspectos parasitários em *A. fulica* foram realizadas coletas de maio de 2012 a junho de 2013 em oito áreas no perímetro urbano do município, com registro de observações sobre os locais de coleta. Cada molusco foi analisado individualmente utilizando a técnica de digestão artificial em solução de ácido clorídrico, com identificação das larvas encontradas. As larvas identificadas como *Metastrongylidae* foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase para a identificação do gênero *Angyostrongylus*. Foram analisados 220 animais e em 28 (12,7%; IC95%: 8,6-17,9) foram encontrados pelo menos um de quatro morfotipos de nematódeos. *Angyostrongylus* não foi registrado nos caramujos examinados. Não houve associação entre variáveis climáticas e a presença de larvas. O local de coleta e o tamanho do caramujo influenciaram no encontro de larvas de nematódeos. Tanto animais parasitados quanto não parasitados apresentaram um crescimento alométrico negativo. O fator de condição relativo não diferiu significativamente entre os grupos. A fim de pesquisar a presença de DNA *Cryptosporidium* ssp. e *Sarcocystidae* nas amostras fecais de *Achatina fulica* foi utilizada a técnica de *nested*-PCR

(nPCR). Para *Cryptosporidium* ssp., amplicons compatíveis com este parasito foram encontrados em 2 de 223 amostras de fezes analisadas. Das 223 amostras de fezes de *Achatina fulica* submetidas à nPCR para detecção de Sarcocystidae, 58 amostras amplificaram o fragmento esperado de 290 pares de base, sendo então submetidas à RFLP. Destas, 41 amostras foram clivadas pelas enzimas utilizadas nesse estudo, produzindo um perfil compatível com *T. gondii*. As outras 17 amostras não foram compatíveis com o Sarcocystidae. Este é o primeiro registro da ocorrência de *A. fulica* no município de Feira de Santana (BA), com pesquisa da associação das variáveis climáticas aos parâmetros biométricos dos animais estudados. Estes resultados indicam que há presença de parasitos de interesse em saúde animal e humana em *Achatina fulica* no município de Feira de Santana, Bahia, demonstrando o potencial destes animais na manutenção e dispersão destes agentes no ambiente.

Palavras-chave: Caramujo gigante africano. Ocorrência. Parasitos. Áreas urbanas.

ABSTRACT

The African snail *Achatina fulica* Bowdich, 1822, is an invasive species that cause environmental and economic damage, as to human and animal health. The aim of this study was to evaluate the occurrence and parasitological aspects of *A. fulica* in Feira de Santana (BA). To assess the occurrence of *A. fulica*, sampling was made from January to June 2013 at four points in the urban perimeter of the city. In the laboratory animals were measured as the total length of the shell and the total mass. From these data the degree of development of the population was estimated, and the relationships between morphometric and climatic variables and the condition factor were calculated. During this period were collected 600 snails showing predominant length in the range of 57.0 to 47.6 mm. Results allowed to infer that the population of *A. fulica* in these sampling points is in decline, since in these areas were found juvenile and young animals. There was no association between climatic and morphometric variables. The relationship between total length and weight showed that *A. fulica* presented a negative allometric growth. The condition factor presented variations on time over the six months of collection. In order to evaluate parasitological aspects in *A. fulica*, animals were collected from may 2012-to june 2013 in eight areas in the urban perimeter of the city. The animals were collected early in the morning and transported to the laboratory of the Zoonoses and Public Health Research Group -UEFS. Each clam was analyzed individually using the artificial digestion technique in hydrochloric acid solution with identification of larvae found. The larvae have been identified as Metastrongylidae were submitted to the polymerase chain reaction for the identification of the genus *Angyostrongylus*. 220 animals were tested and in 28 (12.7; 95: 8.6 -17.9) were found at least one of four morphotypes of nematodes. *Angyostrongylus* has not been registered in snails examined. There was no association between climatic variables and the presence of larvae. The location of collection and the size of the snail influenced in the larvae of nematodes. Both parasited and not parasited animals have negative allometric growth. The relative condition factor did not differ significantly between the groups. Nested-PCR has been used to search *Cryptosporidium* ssp and Sarcocystidae DNA in fecal samples of *Achatina fulica*. Amplicons compatibles with *Cryptosporidium* ssp were found in 2 of 223 stool samples

analyzed. Of the 223 stool samples analysed, in 58 samples we found the 290 base pair fragment expected for Sarcocystidae, and then subjected to RFLP. Of these, 41 samples were cleaved by enzymes used in this study, producing a profile compatible with *T. gondii*. The other 17 samples were not compatible with Sarcocystidae. This is the first record of the occurrence of *A. fulica* in Feira de Santana (BA), with research of association of climatic variables to the biometric parameters of the animals. These results indicate the presence of animal and humana parasites in *Achatina fulica* in the municipality of Feira de Santana, demonstrating the potential of these animals in the maintenance and spread of these agents in the environment.

Key-words: African giant snail. Occurrence. Parasites. Urban areas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Coleta, mês, local de coleta, temperatura (oC), umidade relativa (%), índice pluviométrico (mm), número de animais coletados, mediana do comprimento total (Ct) em cm, mediana da massa corporal (m) em gramas e mediana do fator de condição relativo (Kn) para <i>Achatina fulica</i> , coletados em Feira de Santana no período de janeiro a junho de 2013.	44
Tabela 2.	Coefficientes de correlação e valores de P associados entre variáveis climáticas, comprimento total da concha (mm), massa (g) e fator de condição relativo de <i>Achatina fulica</i> . Feira de Santana, 2013.	45
Tabela 3.	Estatísticas descritivas para o comprimento total da concha de <i>Achatina fulica</i> segundo o local de coleta. Feira de Santana, 2013.	45
Tabela 4.	Frequência absoluta (n) e relativa (%) de <i>Achatina fulica</i> , segundo o estágio de desenvolvimento e o local de coleta. Feira de Santana, 2013.	47
Tabela 5.	Frequência absoluta (N), frequência relativa (%) e intervalo de confiança 95% (IC95%) de morfotipos de Nematoda encontrados em 220 espécimes de <i>Achatina fulica</i> submetidos ao método de digestão em solução de ácido clorídrico 0,7%. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.	62
Tabela 6.	Frequência absoluta (N) e relativa (%) de positivos e negativos para a presença de Nematoda em 220 espécimes de <i>Achatina fulica</i> submetidos ao método de digestão em solução de ácido clorídrico 0,7%, segundo as variáveis epidemiológicas e resultado da estatística. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.	67
Tabela 7.	Correlações entre variáveis climáticas e a porcentagem de positivos em cada coleta. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.	68
Tabela 8.	Estatísticas descritivas de massa corporal e comprimento total da concha de 220 espécimes de <i>Achatina fulica</i> coletados, segundo o resultado do método de digestão em solução de ácido clorídrico 7%. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localização do Município de Feira de Santana e os pontos de coleta de espécimes de *Achatina fulica*. Feira de Santana, 2013.39
- Figura 2. Pontos de coleta de espécimes de *Achatina fulica* em Feira de Santana, BA. 2013.A – L1, B – L2, C – L3, D – L4.40
- Figura 3. Histograma da frequência relativa de espécimes de *Achatina fulica* segundo o comprimento total da concha (em mm). Feira de Santana, 2013.42
- Figura 4. Relação alométrica entre a massa corporal (em gramas) de *Achatina fulica* pelo comprimento total da concha (em mm). Feira de Santana, 2013.49
- Figura 5. Fator de condição mediano para *Achatina fulica* em 23 coletas realizadas de janeiro a junho de 2013. As barras indicam os percentis 25 e 75. Feira de Santana, 2013.49
- Figura 6. Pontos de coleta de *Achatina fulica* em Feira de Santana, BA. 2012-2013.60
- Figura 7. Características morfológicas diferenciais de Nematoda encontrados em *Achatina fulica*. Feira de Santana, 2012-2013.63
- Figura 8. Relação alométrica entre a massa corporal (em gramas) de *Achatina fulica* pelo comprimento total da concha (em mm), para animais positivos (A) ou negativos (B) para a presença de larvas de nematóides. Feira de Santana, 2013.70
- Figura 9. Valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valores máximos do fator de condição relativo (Kn) de 220 espécimes de *Achatina fulica* coletados segundo o resultado do exame de digestão para a presença de larvas de nematóides. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.71
- Figura 10. Produtos da nested-PCR com os oligonucleotídeos dirigidos para um fragmento do gene 18S rRNA contendo 600 pares de bases de *Cryptosporidium* ssp. de amostras fecais do molusco *Achatina fulica*. PM: Marcador de Peso Molecular de 100pb; 1-9: Amostras fecais de *Achatina fulica*; 3: Amostra positiva de *Cryptosporidium* ssp.85

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
Aspectos biológicos e ecológicos de <i>Achatina fulica</i> Bowdich, 1822.....	17
Parasitas de interesse médico e veterinário em <i>Achatina fulica</i>	21
OBJETIVOS 33	
Objetivo Geral.....	33
Objetivos Específicos.....	33
OCORRÊNCIA DE <i>Achatina fulica</i> BOWDICH, 1822(STILOMMATOPHORA; ACHATINIDAE) EM FEIRA DE SANTANA (BA): BIOMETRIA E PESQUISA DA ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS CLIMÁTICAS.....	34
Resumo.....	34
Abstract	35
Introdução	36
Material e Métodos	38
Resultados e Discussão	41
Conclusões.....	50
Agradecimentos.....	51
Referências.....	51
NEMATÓDEOS EM <i>Achatina fulica</i> BOWDICH, 1822 (GASTROPODA: PULMONATA) DA ÁREA URBANA DO MUNICÍPIO DE FEIRA SANTANA (BA).....	55
Resumo.....	55
Abstract	56
Introdução	57
Material e Métodos	59
Resultados e Discussão	62
Conclusões.....	72
Agradecimentos.....	72
Referências.....	73
PESQUISA DE APICOMPLEXA EM <i>Achatina fulica</i> BOWDICH (1822).....	77
Resumo.....	77
Abstract	78
Introdução	79
Materiais e Métodos	81
Resultados e Discussão	84

Conclusões.....	89
Agradecimentos.....	90
Referências.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
REFERÊNCIAS	96
ANEXO A - Autorização para atividades com finalidade científica	102
ANEXO B- Protocolo de extração de DNA de larvas de nematóides usando <i>kit Purelink®</i> <i>Genomic DNA</i>	105
APÊNDICE A – Recuperação e identificação de nematódeos em <i>Achatina fulica</i>	107
APÊNDICE B - Protocolo de extração de DNA de amostras de fezes.....	110

INTRODUÇÃO

Aspectos biológicos e ecológicos de *Achatina fulica* Bowdich, 1822.

Achatina fulica Bowdich, 1822, conhecida como caramujo gigante africano, é uma espécie exótica invasora de importância mundial, causando problemas econômicos, ambientais e de saúde pública em diferentes países onde foi introduzida para exploração comercial (FISCHER et al., 2010).

Essa espécie é originária do leste da África e Madagascar e a sua disseminação se deu pela ação humana pelas regiões da Tailândia, China, nas Ilhas do Pacífico, Austrália, Japão, e recentemente, pelo continente americano (VASCONCELLOS, PILLE, 2001). Na América a sua introdução iniciou-se pelo Havaí, em 1939, tendo alcançado a Califórnia ao fim da Segunda Guerra Mundial. Foi registrada na Flórida no início da década de 70 (TELES et al., 1997).

No Brasil a introdução ocorreu de maneira clandestina na década de 80 em uma feira agropecuária no Paraná, com a finalidade de venda de exemplares para a comercialização da carne desse gastrópode, como alternativa de rendimento rápido e seguro, em substituição do tradicional *escargot Helix aspera*, que colocaria o Brasil como o principal fornecedor dessa iguaria consumida em toda Europa, mas devido à pouca aceitação do mercado brasileiro, esses animais foram liberados e abandonados dos locais de criação, sem nenhum tipo de manejo (TELES, 2002; FISCHER et al., 2010)

No contexto atual esse molusco está distribuído em 25 dos 26 estados brasileiros, mais o Distrito Federal (THIENGO et al., 2013). Segundo esses mesmos autores, a rápida dispersão pelo país seguiu um padrão semelhante à disseminação inicial no estado do Paraná, isto é, a introdução para fins comerciais, seguido pela liberação dos caramujos na natureza. Os estados com o maior número de municípios infestados estão localizados no Sudeste e no Centro-Oeste do Brasil, ou seja, nos Estados de Goiás (75 municípios), São Paulo (69), Rio de Janeiro (57), Mato Grosso (38), Espírito Santo (23) e Minas Gerais (20). Os

menores números de municípios infestados em outros estados podem refletir a falta de inquéritos, bem como um baixo nível real de infestação (THIENGO et al.,2007)

A. fulica é uma espécie de molusco terrestre tropical cuja classificação é a seguinte (Myers et al., 2012):

Reino Animalia

Eumetazoa

Bilateria

Protostomia

Lophotrochozoa

Trochozoa

Mollusca

Classe Gastropoda

Ordem Stylommatophora

Familia Achatinidae

Gênero *Achatina*

Espécie: *Achatina fulica*

É um animal de grande porte e com notável capacidade reprodutiva, com conchas adornadas por faixa de coloração variável (que vão do castanho até levemente arroxeadas), marcadas por estrias bem visíveis, e com até oito giros que crescem rapidamente. A volta do corpo é bem dilatada, com abertura grande. Os adultos alcançam facilmente mais que 10 a 12 cm de comprimento e cinco a seis cm de diâmetro; os maiores exemplares da espécie pesam até 500g, com conchas medindo 20 cm de comprimento e 8 cm de largura. Além disso, possuem dois pares de antenas, com olhos no ápice do par anterior (TELES et al., 2002).

O habitat natural desse gastrópode na África é principalmente nas margens de florestas tropicais. Também são encontradas em plantações que circundam os fragmentos de mata. Esse animal possui uma boa adaptação e muitas vezes apresentam uma preferência por ambientes alterados, porém também podem ocorrer em florestas primárias e secundárias (RAUT, BARKER, 2002).

Esse animal é hermafrodita protândrico, ou seja, apresentam ambos os sexos, sendo a maturação da gônada masculina anterior à feminina, sendo a cópula recíproca, o que caracteriza uma estratégia eficaz, uma vez que ambos os caramujos são fecundados. O cortejo pode levar horas e até mais de um dia e envolve o contato físico e utilização da rádula. A cópula dura em média de seis a oito horas, mas há casos em que a cópula se estende por 24 horas. A oviposição ocorre do décimo ao trigésimo dia após a cópula e varia de acordo com a disponibilidade de albume e cálcio. Os seus ovos são depositados em covas feitas no solo, porém esses animais só iniciam a oviposição se encontrarem condições favoráveis para a escavação, com terra fofa e umidade ideal. A deposição dos ovos pode levar de 7 a 30 horas, ou até vários dias. Após a oviposição, o molusco cobre os ovos com terra e permanece por perto por mais de meia hora, embora haja registros de permanência de até 52 horas. Esses gastrópodes podem interromper a postura de ovos, caso as condições ambientais não sejam favoráveis (TOMIYAMA, 1994, 2002; RAUT, BARKER, 2002). As posturas podem representar de 13 a 442 ovos, sendo a variabilidade muito grande, mesmo dentro de uma população (RAUT, BARKER, 2002).

O molusco possui hábitos noturnos e crepusculares, são altamente dependentes de umidade e em momentos de precipitação chuvosa, os caramujos são facilmente vistos nas mais diferentes superfícies, que incluem paredes e telhados, troncos de árvores, e no solo por entre folhiço, gramados e jardins (TELES, et al., 2002). Ficher, Colley (2004, 2005) relatam que em áreas antrópicas esse animal usa qualquer cavidade escura e protegida, como espaços formados pelos entulhos, vasos de plantas e resíduos sólidos. Durante o dia esses caramujos ficam enterrados ou suspensos em caules de árvores ou muros e parede (FISCHER, AMADIGI, 2010).

Achatina fulica é tida como uma espécie herbívora generalista se alimentando de folhas, frutos e caules, é altamente voraz, o que lhe confere o *status* de praga, principalmente em pequenas plantações (VASCONCELLOS, PILE 2001; COSTA, 2006). Além de consumir vegetais, esses gastrópodes terrestres consomem terra úmida, hábito que coloca essa espécie na categoria de animais decompositores, fazendo a ciclagem de nutrientes às vezes muito mais rápida do que bactérias e fungos. Como fontes de cálcio esses animais se alimentam de cimento ou raspam a concha do coespecífico (FISCHER, COLLEY, 2005). Existem registros na literatura de *A. fulica* se alimentando resíduos sólidos urbanos, principalmente se estiverem úmidos, com destaque para caixas de papelão e restos de comida, o que explica a sua presença preferencial na área urbana, depósitos de lixo e próximos a resíduos sólidos orgânicos jogados em terrenos baldios (FISCHER, COSTA, 2008).

Esse gastrópode possui uma grande resistência física aos fatores bióticos e abióticos e um conjunto somatório de características físicas individuais e estratégias comportamentais. Por exemplo, a concha é uma estratégia importante contra inimigos, a força física também pode ser considerada como uma estratégia de defesa, geralmente está relacionada com o deslocamento de grandes quantidades de solo (FISCHER, AMADIGI, 2010). O muco secretado pela superfície do corpo também é uma forma de resistência, pois este pode ser utilizado na locomoção, alimentação, osmorregulação, reprodução, proteção e como antimicrobiano, porém a sua composição pode ser influenciada por inúmeros fatores, inclusive a alimentação (LORENZI, MARTINS, 2008).

Achatina fulica utiliza a quienescência, ou seja, a permanência fora de atividade por períodos longos ou curtos, como estratégia de proteção contra extremos de temperatura e perda de água. Outros mecanismos de defesa como a hibernação e a estivação são importantes, pois beneficia o seu potencial de invasor, sendo a hibernação um processo fisiológico que requer preparações metabólicas mais elaboradas, enquanto que a estivação é um fenômeno mais simples (MEAD, 1961). Esses processos ocorrem principalmente na estação seca ou abaixo de 10°C, no entanto existem registros de atividade com 28-30° C e 80-82% de umidade relativa do ar (RAUT, BARKER, 2002). Durante a estivação o molusco produz o epifragma, uma estrutura calcificada que previne a desidratação, isto ocorre

quando os animais passam por um período desfavorável e diminuem o metabolismo (FISCHER, AMADIGI, 2010).

A resistência aos fatores abióticos como umidade relativa do ar e temperatura são estratégias importantes para a sobrevivência de *A. fulica* e afetam mais do que a falta de comida e água. Acredita-se que a umidade relativa do ar seja um fator mais crítico do que a temperatura (RAUT, BAKER, 2002; FISCHER, AMADIGI, 2010).

Outros mecanismos de defesa podem ser usados além da concha e da estivação. Esse gastrópode se protege contra desidratação e inimigos ao se esconder sob pedras, em cavidades de árvores, entre a vegetação e ao enterrar-se, a até mais de 12 cm de profundidade (FISCHER, AMADIGI, 2010).

Todas essas estratégias são importantes evolutivamente para manter populações mínimas de *A. fulica* no ambiente, já que pode haver muitas perdas diante das modificações ocorridas no ambiente no qual se origina. No entanto, se esses animais encontrarem condições climáticas favoráveis e alimentos disponíveis, diminuindo a competição e amenizando variações de temperatura e umidade, os mesmos maximizam essas perdas aumentando a densidade populacional. Em ambientes urbanos, com grande disponibilidade de alimentos e abrigos, favorecem a colonização e proliferação dos caramujos (FISCHER, AMADIGI, 2010).

Sabendo-se dos aspectos ecológicos e biológicos dessa espécie invasora, torna-se imprescindível a elaboração de planos de manejos para diagnosticar o perfil da população de *A. fulica* na área onde esta foi introduzida, possibilitando erradicação à realidade local (FISCHER, 2010).

Parasitas de interesse médico e veterinário em *Achatina fulica*

No Brasil alguns moluscos terrestres são capazes de transmitir algumas helmintoses de interesse médico. Dentre elas estão a fasciolose, angiostrongilose abdominal e a meningoencefalite eosinofílica. (THIENGO, FERNANDEZ, 2013).

Existe um grande número de parasitos que afetam a saúde humana ou dos animais, hospedam-se em moluscos e participam da complexidade de ciclos e interações que resultam na contínua evolução das espécies (FRANCO-ACUÑA et al., 2009). Segundo Teles, Fontes (2002), o gastrópode terrestre *A. fulica* e outras espécies de moluscos continentais e aquáticos são responsáveis pela transmissão dos nematódeos da família Metastrongylidae, gênero *Angiostrongylus*. Até o momento são reconhecidos cerca de 20 espécies desses vermes parasitos naturais de roedores silvestres, além de numerosos mamíferos, como bovinos, eqüinos, ovinos, macacos, cães, gatos e ratos urbanos.

A família Metastrongylidae merece destaque por incluir *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cépedes 1971, *Angiostrongylus cantonensis* Chen 1935 e *Angiostrongylus vasorum* Baillet 1866, tendo importância médica e veterinária. Os Metastrongylidae possuem extremidade anterior com primórdio da cápsula bucal, primórdio genital situado no terço médio do corpo da larva L₃, extremidade posterior com ânus e nítida presença de apêndice (OLIVEIRA et al., 2010).

O *Angiostrongylus costaricensis* é um nematódeo endêmico nas Américas, e foi registrado no norte da Argentina ao Sul dos Estados Unidos (CÉSPEDES et al., 1967; MORERA; CÉSPEDES, 1971; MORERA et al., 1983), com casos humanos registrados na Costa Rica, Honduras, Colômbia, Martinique, República Dominicana, Porto Rico, Nicarágua, México, Venezuela, Guadalupe, El Salvador, Panamá e Brasil (KAMINSKY, 1995).

Esse nematódeo apresenta corpo filiforme e cor avermelhada. A fêmea tem tamanho aproximado de 33 mm de comprimento, tendo na extremidade final da região posterior ânus e vulva. O macho tem cerca de 20 mm de comprimento, tendo uma bolsa copuladora reduzida com dois espículos iguais e finos, ainda possui gubernáculo. Em ambos os sexos a abertura oral é rodeada por seis pequenos lábios. Os ovos são elípticos e não estão segmentados por ocasião da postura (MORERA, CÉSPEDES, 1971; MOTA, LENZI, 1995).

O ciclo natural desse parasito envolve moluscos terrestres, como hospedeiros intermediários e roedores e pequenos mamíferos, como hospedeiros definitivos. Esses parasitos adultos habitam preferencialmente as artérias da região ileocecólica, que são ramos da mesentéria superior. Aí depositam seus ovos, que são arrastados pelo sangue arterial para a mucosa intestinal, onde embrionam e eclodem. As larvas de primeiro estágio atravessam a mucosa e caem na luz do intestino, sendo levadas para o exterior através das fezes. Essas larvas são ingeridas ou penetram ativamente nas partes moles do molusco, onde evoluem e sofrem duas mudas (L_1-L_2 , no 4º dia, e L_2-L_3 , entre o 11º e o 14º dias). Ao fim de 18 dias já se encontram as larvas infectantes maduras, que persistem durante muito tempo no molusco ou vão sendo eliminadas com a secreção mucosa deste. O hospedeiro vertebrado, ao ingerir o molusco infectado, contrai a larva L_3 e, depois de um período pré-patente de 24 dias, começa a eliminar L_1 em suas fezes. Ele pode infectar-se também ingerindo vegetais sobre os quais os moluscos terrestres deixaram sua esteira de secreção mucosa, onde se encontram eventualmente as larvas de terceiro estágio de *A. costaricensis* (REY, 2000).

A transmissão para o homem ocorre de maneira acidental através da ingestão de moluscos crus ou mal cozidos e de hortaliças contaminadas com o muco contendo a forma infectante da larva, causando no homem a angiostrongilose abdominal (THIENGO, FERNANDEZ, 2010).

A angiostrongilose abdominal humana é caracterizada por obstruções intestinais, inflamações do ceco e do apêndice cecal, geralmente acarretando o óbito. Os sintomas, como dor abdominal, febre prolongada, anorexia e vômitos, podem ser confundidos com outras doenças como, por exemplo, a apendicite (GRAEFF-TEIXEIRA, 2007). O tratamento para essa zoonose, até o momento, é a intervenção cirúrgica, nos casos graves. Deve-se evitar os anti-helmínticos, pois podem induzir à migração errática do parasito, muitas vezes agravando a doença (THIENGO, FERNANDEZ, 2010).

O *A. cantonensis* é um nematódeo pulmonar de roedores urbanos e periurbanos, associado à meningite eosinofílica no homem. Essa espécie foi recuperada pela primeira vez

em 1944, na cidade de Formosa Taiwan (NOMURA, LIN, 1945). No Brasil foi descrita pela primeira vez em 2007, na cidade de Cariacica, no Estado do Espírito Santo (CALDEIRA et al., 2007).

Este parasito é um nematódeo heteroxênico, que apresenta condutos genitais brancos acinzentados. Os vermes adultos de ambos os sexos apresentam corpo filiformes, estreitando-se na extremidade anterior. As fêmeas são mais largas e mais robustas que os machos. O esôfago é claviforme e o poro excretor é posterior ao esôfago. Os machos possuem uma cauda bursal pequena e ligeiramente assimétrica, e medem de 15 a 22 mm de comprimento por 250 a 350 μm de largura. A cauda é longa e arredondada, e é ligeiramente curvada ventralmente (THIENGO et al., 2010).

O ciclo de vida de *A. cantonensis* envolve várias espécies de moluscos terrestres e límnicos como hospedeiros intermediários e como hospedeiros definitivos os roedores. Na fase adulta esse parasito ocorre nas artérias pulmonares dos hospedeiros definitivos, comumente *Rattus rattus* e *R. norvegicus*, e após acasalamento, eliminam ovos que chegam ao lúmen intestinal e liberam larvas de primeiro estágio (L_1), que se desloca para o interior dos alvéolos. Depois as larvas (L_1) migram para a faringe e são deglutidas, passam no trato gastrointestinal e são eliminadas nas fezes. Essas larvas são ingeridas ou penetram ativamente nas partes moles do molusco, em um período de duas a três semanas, sofrem duas mudas (L_2 - L_3) e atingem o terceiro estágio (L_3), a forma infectante para os vertebrados. Os roedores se infectam ao ingerirem moluscos infectados com a larva (L_3). Essas larvas (L_3) penetram na parede intestinal e entram na corrente sanguínea poucas horas depois da ingestão. Elas alcançam a circulação pulmonar a partir do coração e são dispersas para vários outros órgãos pela circulação arterial. Muitas alcançam o cérebro e sofrem mudas novamente, tornando-se larvas de quarto estágio (L_4). A quinta muda (L_5) ocorre no espaço subaracnóide, e após o desenvolvimento migra para as artérias pulmonares onde são encontradas 25 dias depois da infecção. Os vermes adultos alcançam a maturidade sexual em torno de 35 dias e as larvas (L_1) podem ser encontradas nas fezes dos roedores em torno de 42 dias após a exposição à geração anterior de larvas (L_1) (THIENGO et al., 2013).

A infecção humana também é acidental, semelhante ao de *A. costaricensis*, diferenciando-se somente pela ingestão de hospedeiros paratênicos (peixes, crustáceos, anfíbios e répteis) crus ou mal cozidos (THIENGO, FERNANDEZ, 2010). A doença causada por *A. cantonensis* é denominada meningite eosinofílica humana.

Essa doença em geral evolui de forma benigna, com complicações mais graves apenas quando o verme migra para o globo ocular, podendo acarretar cegueira. No entanto, a sintomatologia (cefaléia, tonturas, fraqueza e febres moderadas) persiste por alguns meses e prejudica a rotina do paciente (TELES, FONTES, 2002).

Além dos nematódeos de importância médica encontrado em *A. fulica* há registros de nematódeos de interesse veterinário.

O *Angiostrongylus vasorum* é um parasito da árvore arterial pulmonar de cães domésticos, que se encontra amplamente disseminado na Europa ocidental (BOWMAN, 2006). Esse parasito apresenta um corpo com extremidades afiladas, possui uma cutícula transparente e condutos genitais de coloração branco-acinzentada, enrolados nos tubos digestivos de cor vermelha. A extremidade posterior do macho é voltada ventralmente. Os ovos são elípticos e não segmentados por ocasião da postura. O comprimento dos machos varia de 14 a 18 mm e o das fêmeas de 18 a 25 mm (FORTES, 2004).

A ovipostura do parasito é na artéria pulmonar e os ovos são levados pelos capilares aos pulmões, onde evoluem as larvas de primeiro estágio que são eliminadas nas fezes de cães infectados. Os hospedeiros intermediários incluem uma ampla variedade de moluscos terrestres e límnicos, que se infectam através da ingestão de larvas (L₁) presentes nas fezes dos cães ou penetra ativamente nos moluscos, nas quais se desenvolvem até o terceiro estágio larval infectante. A via pela qual os cães se infectam não é clara. Supõe-se que os cães se infectam ao ingerirem moluscos infectados com a larva (L₃). Além disso, as atividades dos moluscos em relação ao comportamento dos cães e o uso do habitat são prováveis

fatores de risco para a infecção (MORGAN, SHAW, 2010). Os cães podem apresentar um quadro clínico com dispnéia que pode evoluir para asfixia (FORTES, 2004).

No Brasil não há registros de *A. vasorum*, infectando naturalmente o molusco *A. fulica*, no entanto, a presença desse molusco pode ser um risco para a transmissão desses parasitos, especialmente em áreas urbanas, devido à pouca especificidade desses nematódeos quanto aos hospedeiros intermediários (CARVALHO et al., 2003; THIENGO, 2004).

Uma espécie, *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898), é comum nos pulmões de gatos domésticos, e possuem como hospedeiros intermediários muitos moluscos. A sua distribuição é cosmopolita (URQUHART et al., 1998), sendo encontrado em pequenas ramificações de artérias pulmonares, alvéolos, dutos alveolares e bronquíolos (FORTES, 1997). Apresenta extremidade anterior arredondada, corpo filiforme, com extremidade posterior curvada dorso-ventralmente, primórdio queratinizado refringente da cápsula bucal, poro excretor evidente, situado na região média do esôfago, anel nervoso localizado na região mediana do esôfago, primórdio genital localizado na região ventral está situado no terço médio do intestino e cauda pontiaguda apresentando um botão terminal característico (OLIVEIRA et al., 2010; THIENGO, 2009).

Esses parasitos são ovovivíparos, e as (L₁) são eliminadas nas fezes. Estas penetram no hospedeiro intermediário molusco e se desenvolvem nas (L₃) infectantes, e durante esta fase pode ser ingerido por hospedeiros paratênicos, como aves e roedores (FORTES, 2004). A transmissão para os gatos ocorrem quando ingerem os hospedeiros intermediários ou paratênicos contendo larvas infectantes (L₃). Essas larvas no ambiente podem sobreviver até duas semanas (FERREIRA DA SILVA et al., 2005; SCOFIELD et al., 2005). Segundo URQUHART et al. (1998), os efeitos clínicos são leves, entretanto o gato pode apresentar tosse crônica, pode haver uma leve dispnéia e produção de catarro mucóide. Os casos mais graves aparecem em seis a doze semanas após a infecção, quando a postura de ovos é máxima.

Outras larvas de nematódeos identificadas como *Rhabditis* sp. (Dujardin, 1844) e *Strongyluris* sp. (Travassos, 1923) também foram encontrados em *A. fulica*. O gênero

Rhabditis sp. vive em matéria orgânica em decomposição, terra úmida, água doce e salgada. Esse gênero inclui parasitos facultativos oportunistas, do homem e animais, causando infecções secundárias. Possui esôfago longo do tipo rhabditóide constituído de corpo, pseudobulbo, istmo e bulbo posterior, vulva localizada na região mediana do corpo, ovários com aspecto segmentado indicando agrupamento celular característico; útero com presença de ovos e ovos larvados nas fêmeas adultas, cauda longa e fina (THIENGO, 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

Esse nematódeo causa uma dermatite pruriginosa e hiperêmica em bovinos, suínos, cães, eqüinos e roedores excessivamente expostos ao habitat normal desse parasito (BOWMAN, 2006). No Brasil, esse gênero está relacionado com a otite parasitária em bovinos (MARTINS et al., 1971; DUARTE et al., 2001).

O nematódeo *Strongyluris* sp. é um parasito que vive no intestino grosso de larcertídeos (ALHO, 1969). Essas larvas são facilmente distinguíveis principalmente pelo grande tamanho (em torno de 5 mm). Possui lábios com papilas, anel nervoso posicionado no terço médio do esôfago, que termina em um bulbo esofagiano, intestino com a extremidade anterior dilatada, cauda longa que se afina gradativamente, podendo se apresentar curta em alguns exemplares (THIENGO, 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

A identificação das larvas de nematódeo é dificultada pela falta de informação sobre a morfologia destes parasitos. Portanto, a caracterização dos nematódeos encontrados em *A. fulica* é relevante, porque são escassas as descrições na literatura sobre morfologia das larvas encontradas nesses animais (FRANCO- ACUÑA et al., 2008), mesmo com ampla distribuição do molusco pelo país.

Além do potencial transmissor de doenças conhecidas como angiostrongilose, o molusco *A. fulica* pode ser vetor de outros organismos.

Entre os protozoários parasitos, a literatura registra apenas o estudo de *Cryptosporidium* em *A. fulica*. Esse protozoário é um coccídio pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidia, Sub ordem Eimeriina,

Família Cryptosporidiidae, Gênero *Cryptosporidium* (LEVINE et al., 1980), encontrado em 90 países, seis continentes e em aproximadamente 170 espécies de animais silvestres, domésticos e o ser humano (O' DONOGHUE, 1995; FAYER et al., 2000). É o responsável pela criptosporidiose, doença comumente associada a enterites que são caracterizados por diarreia aguda, aquosa ou estetorréica e cólica. Embora as infecções assintomáticas também sejam relatadas (PEREIRA, 2007).

A transmissão desta protozoose é através da rota fecal-oral, de homem-homem, animal-homem, homem-animal e animal-animal, podendo ser por ingestão direta das fezes, água, alimentos contaminados e o ar. Também está associada como fonte de infecção a água de piscinas de recreação (MONIS et al., 2003; FAYER, 2004).

Cryptosporidium sp. possui o ciclo de vida monoxeno, onde a fase (sexual e assexual) ocorre em um único hospedeiro (AMARANTE, 1992; O' DONOGHUE, 1995). O ciclo biológico inicia-se com ingestão dos oocistos viáveis presentes na água ou alimento contaminados. O desencistamento ocorre pela exposição a temperaturas corporais, ácido gástrico, tripsina e sais biliares. Os esporozoítos liberados penetram nas células intestinais. Forma-se então um vacúolo parasitóforo intracelular, porém extracitoplásmico. Neste local os esporozoítos transformam-se em trofozoítos e sofrem divisão múltipla, formando o meronte, onde são gerados merozoítos do tipo I ou tipo II, por meio de reprodução assexuada. Os merozoítos de tipo I são capazes de infectar outras células e repetir a reprodução assexuada. Os merozoítos de tipo II iniciam o ciclo sexuado (gametogonia), gerando gametas masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos). Cada microgameta fertiliza um macrogameta, produzindo o zigoto, dentro de um oocisto, o qual sofre meiose e dá origem ao oocisto esporulado. Os oocistos são liberados na luz intestinal e excretados nas fezes (PEREIRA, 2007).

O oocisto maduro, esférico ou ovóide, com cerca de cinco μm de diâmetro contém quatro esporozoítos e a ausência do esporocisto que é uma característica do gênero. Os oocistos de algumas espécies podem se diferenciar uma das outras com base na morfometria, especificidade de hospedeiros, transmissão cruzada e taxonomia molecular

(SMITH et al., 2007). Esses podem permanecer infecciosos sob condições úmidas e frias, por aproximadamente 18 meses. Em ambientes de água doce sobrevivem em média 176 dias e 35 dias em água do mar (CAREY, 2004; FALCHI, 2006). Como muitos outros oocistos de coccídeos, os de *Cryptosporidium* mostram resistência à desinfecção química. Estes são bastantes resistentes a desinfetantes comerciais a base de álcool, amônia, adeído, cloro ou compostos alcalinos (PEREIRA et al., 2008).

Estes oocistos já são eliminados infectantes nas fezes de seus hospedeiros. Indivíduos imunodeficientes e animais jovens liberam juntamente com as fezes aproximadamente 10^9 - 10^{10} oocistos de *Cryptosporidium*, o que pode proporcionar a contaminação da água, solo e dos alimentos (FAYER et al., 2004).

O potencial de contaminação de oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente depende de uma variedade de fatores incluindo, o número de hospedeiros infectados, o número de oocistos excretados, práticas agrícolas, o comportamento e a atividade do hospedeiro, as diferenças sócio-econômicas e éticas no comportamento humano, distribuição geográfica, saneamento, proteção de fontes e suprimentos de água potável e alimentos, e o clima e hidrologia da área (SLIFKO, 2000). A contaminação ambiental e a transmissão de *Cryptosporidium* sp. se dá por animais domésticos, silvestres terrestres e marinhos (GRECA, 2010).

Poucos estudos registram a detecção desses parasitos em moluscos gastrópodes terrestres. No Brasil, existe um registro referente à detecção de *Cryptosporidium* nas fezes do molusco *A. fulica* em trabalho realizado em Campos dos Goytacases, RJ. Dos 50 animais examinados, 52% estavam infectados com o protozoário, e a morfometria dos oocistos encontrados aponta para as espécies que frequentemente infectam cães, gatos ou o homem (SHIFFLER et al., 2008).

O protozoário *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) possui um ciclo heteroxeno facultativo. Pode infectar os animais homeotérmicos (mamíferos e aves), inclusive o homem. É prevalente em muitas regiões do mundo e tem importância médica e veterinária, pois pode causar a toxoplasmose, doença que causa uma infecção crônica

assintomática na maioria dos indivíduos imunocompetentes (TENTER, 2000). É capaz de determinar uma forma grave e geralmente fatal nos casos de transmissão congênita, causando problemas neurológicos e oftalmológicos nos recém-nascidos e em pacientes com imunodepressão causando a encefalite (BLACK, BOOTHROYD, 2000; HILL, DUBEY, 2002).

De acordo com Levine et al. (1980), o *T. gondii* foi classificado como parte do: Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma*, com apenas uma espécie, *Toxoplasma gondii*.

Este protozoário possui como hospedeiros definitivos os membros da família Felidae e os hospedeiros intermediários os animais homeotérmicos incluindo os seres humanos. Nos felídeos ocorre uma fase sexuada dentro das células epiteliais do intestino e uma fase assexuada ocorrendo em outros tecidos. Os hospedeiros intermediários possuem apenas a fase assexuada (TENTER et al., 2000; BLACK, BOOTHROYD, 2000).

Existem três formas que são infecciosos para os hospedeiros: taquizoítos (em grupo), os bradizoítos (cistos teciduais) e esporozoítos (oocistos). Tanto os hospedeiros definitivos como os intermediários são susceptíveis aos três estágios de infecção pelas vias: (1) horizontal, através da ingestão de oocistos esporulados (infecciosos) presentes no meio ambiente; (2) horizontal pela ingestão de cistos teciduais contidos em carne crua ou mal cozida e (3) vertical, pela transmissão transplacentária por taquízoitos (DUBEY, 2002; TENTER et al., 2000; BLACK, BOOTHROYD, 2000).

Um hospedeiro susceptível, ingerindo oocistos infecciosos presentes no solo, água ou nos alimentos contaminados, cistos teciduais presentes em carne crua ou mal cozida ou taquizoítos eliminados no leite, poderá adquirir o parasito e desenvolver a fase assexuada (NEVES, 2005). A fase inicial de infecção-fase proliferativa caracteriza a fase aguda da doença. Neste ponto, a evolução poderá ocorrer em fetos e indivíduos com comprometimento imunológico, ou diminuir e cessar pelo surgimento de anticorpos específicos. Com o aparecimento da imunidade, os parasitos extracelulares desaparecem do sangue, linfa e dos órgãos viscerais, havendo diminuição da multiplicação extracelular. Os

taquizoítos resistentes desenvolvem-se mais lentamente formando os bradizoíto, que formarão cistos principalmente no cérebro e na musculatura esquelética e cardíaca. Esta fase cística, juntamente com a diminuição da sintomatologia, constitui a fase crônica da doença. (DUBEY, 1998; BLACK, BOOTHROYD, 2000; TENTER et al., 2000).

Após a ingestão de cistos pelo hospedeiro definitivo, sua parede é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e no intestino delgado. Os bradizoítos penetram nas células epiteliais do intestino delgado e iniciam inúmeras multiplicações assexuadas. No interior dessas células os parasitos, são chamados de taquizoítos, crescem e se transformam em esquizontes por um processo assexuado chamado endopoligenia que originam os merozoítos. Ao estágio final da multiplicação assexuada inicia-se a fase sexuada, com os merozoítos originando macrogameta (feminino) e microgameta (masculino), cada microgameta fertiliza um macrogameta, produzindo o zigoto, que depois de secretar a parede cística origina o oocisto. Os oocistos caem na luz intestinal ao serem rompidas as células da parede intestinal (TENTER et al., 2000 FORTES, 2004;). Os oocistos não esporulados são sub-esféricos e possuem de 10 a 12 micromêtros de diâmetro (DUBEY; LINDSAY; SPEER 1998), e deixam o lúmen intestinal e vão para o meio ambiente através das fezes dos felídeos (TENTER et al., 2000).

Esses oocistos inicialmente não esporulados (não infecciosos) e sob condições de temperatura e aerobiose adequadas tornam-se esporulados. Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos, que possui quatro esporozoítos que são as formas mais resistentes do *Toxoplasma gondii* suportando diversas variações de temperatura. Eles se mantêm infecciosos em água por pelo menos 54 meses a 4°C (DUBEY, 1998) e, em solos experimentalmente contaminados por 18 meses sob várias temperaturas (FRENKEL et al., 1975). Os oocistos esporulados também são altamente resistentes à inativação por reagentes químicos e processos utilizados no tratamento de águas incluindo a cloração, o tratamento de ozônio e os raios ultravioletas (DUBEY, 2010; VIEIRA, 2010).

Os gatos domésticos e outros felídeos iniciam a eliminação de oocistos dependendo do estágio de *T. gondii* ingerido, de 13 a 18 dias após a ingestão de taquizoítos ou oocistos,

e, após a ingestão de cistos teciduais ou bradizoítos, tem um período pré-patente menor (3 a 10 dias) (DUBEY, 2008). Menos de 50% dos gatos eliminam oocistos após terem ingerido taquízoítos ou oocistos, e quase todos eliminam oocistos após a ingestão de cisto tecidual (DUBEY, 2010). Após a infecção primária com cistos teciduais desse parasito, um único gato pode lançar mais de 100 milhões de oocistos no ambiente (DUBEY, 2004).

Assim, os gatos domésticos apresentam um papel fundamental na epidemiologia da toxoplasmose (DUBEY, 1986), uma vez que contaminam as águas, o solo, frutas e vegetais, com oocistos eliminados pelas suas fezes (TENTER et al., 2000; VIEIRA, 2010), portanto, pode-se dizer que os oocistos eliminados resultam na contaminação ambiental (DUBEY, 2004). Os oocistos eliminados junto com as fezes são distribuídos no ambiente através da água, vento, adubo e por invertebrados terrestres, contaminando águas, solo, frutas e vegetais (TENTER et al., 2000; DUMÉTRE, DARDÉ, 2003), sendo uma fonte potencial de infecção para o homem e outros hospedeiros intermediários (TENTER et al., 2000). Até o momento, não existe registro da presença de *T. gondii* em moluscos terrestres.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Descrever a ocorrência e os aspectos parasitários em *Achatina fulica* no município de Feira de Santana- Bahia.

Objetivos Específicos

Avaliar o grau de desenvolvimento de *A. fulica* no município de Feira de Santana – Bahia;

Relacionar variáveis morfométricas, incluindo o fator de condição relativo, às variáveis climáticas;

Verificar a frequência de larvas de nematódeos em *A. fulica* provenientes do município de Feira de Santana;

Relacionar frequência de nematódeos a variáveis climáticas, epidemiológicas e sua influência sobre o fator de condição;

Pesquisar a presença de DNA de parasitos Apicomplexa nas amostras fecais de *Achatina fulica*.

OCORRÊNCIA DE *Achatina fulica* BOWDICH, 1822(STILOMMATOPHORA; ACHATINIDAE) EM FEIRA DE SANTANA (BA): BIOMETRIA E PESQUISA DA ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS CLIMÁTICAS.

Patrícia Hercília Arcanjo de Almeida¹, Sofia Aline Amaral Santos², Aristeu Vieira da Silva³

Resumo

O caramujo gigante africano, *Achatina fulica*, encontra-se amplamente distribuído pelo Brasil, causando impactos à economia, a saúde humana e a agricultura. Assim, esse estudo visou avaliar a dinâmica populacional e o grau de desenvolvimento dessa espécie no município de Feira de Santana (BA), bem como relacionar as variáveis morfométricas às climáticas, e estimar o fator de condição relativo. De janeiro a junho de 2013 foram coletados caramujos em quatro pontos no perímetro urbano do município. No laboratório os animais foram mensurados quanto ao comprimento total da concha e a massa total. A partir desses dados o grau de desenvolvimento da população foi estimado, as relações entre as variáveis morfométricas e climáticas e o fator de condição foram calculados. Um total de 600 caramujos foi coletado, apresentando comprimento predominante no intervalo de 47,6-57,0mm. Os resultados permitem inferir que a população de *A. fulica* nos pontos de coleta estudado está em declínio, já que nessas áreas foram encontrados animais juvenis e jovens. Não houve associação entre as variáveis climáticas e morfométricas. A relação entre o comprimento total e o peso mostrou que *A. fulica* apresentou um crescimento alométrico negativo. O fator de condição apresentou variações pontuais ao longo dos seis meses de coleta. Este é o primeiro relato de ocorrência de *A. fulica* em Feira de Santana, BA, com pesquisa da associação das variáveis climáticas aos parâmetros biométricos dos animais estudados.

Palavras-chave: Caramujo gigante africano. Fator de condição. Ambientes antropúrgicos.

¹ Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Zoologia (PPG-Zoo), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA; bolsista de Mestrado FAPESB.

² Acadêmica do PPG-Zoo/UEFS, Feira de Santana, BA; bolsista de Mestrado CAPES.

³ Coordenador do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas (DBIO), UEFS, Feira de Santana, BA; bolsista de Produtividade em Pesquisa nível 2 CNPq.

Abstract

The giant African snail, *Achatina fulica*, is widely distributed in Brazil, causing impacts to the economy, human health and agriculture. Thus, this study aimed to evaluate the population dynamics and the degree of development of this species in the municipality of Feira de Santana (BA), the degree of correlation of morphometric and climatic variables, and to estimate the relative condition factor. From January to June 2013 snails were collected at four points in the urban perimeter of the municipality. In the laboratory animals were measured as the shell total length and the total body mass. From these data the degree of development of the population was estimated, the relationships between morphometric and climatic variables and the condition factor were calculated. A total of 600 snails were collected, showing predominant length in the range of 57.0 to 47.6 mm. The results allow to infer that the population of *A. fulica* in the collection points is in decline, since in these areas were found juvenile and young animals. There was no association between climatic and morphometric variables. The relationship between total length and weight showed that *A. fulica* presented a negative allometric growth. The condition factor presented variations on time over the six months of collection. This is the first report of occurrence of *A. fulica* in Feira de Santana, BA, with research of the correlation of climatic variables to the biometric parameters of the studied animals.

Key-words: African giant snail. Condition factor. Anthropic environments.

Introdução

As introduções de espécies exóticas invasoras são consideradas a segunda maior causa de extinção de espécies no planeta, afetando diretamente a biodiversidade, a economia e a saúde humana (CORADIN, TORTATO, 2006). A espécie *Achatina fulica* Bowdich, 1822, conhecida como caramujo-gigante africano, é considerada uma das cem piores espécies invasoras no mundo, tendo sido introduzida em diversos países, mostrando grande sucesso de proliferação e adaptação (ALOWE et al., 2004).

Essa espécie é endêmica da costa leste africana, partindo do Sul da Somália até Moçambique, região caracterizada por um bioma de florestas chuvosas tropicais (RAUT, BARKER, 2002). Atualmente está disseminada pela Ásia, Oceania e Europa (VASCONCELLOS, PILLE, 2001). Segundo esses mesmos autores, a introdução e distribuição desse gastrópode nas Américas ocorreram, provavelmente, na década de 30. No Brasil, a sua introdução ocorreu no estado do Paraná no final da década de 80, para fins econômicos. Uma vez que a criação para fins alimentares não conseguiu o mercado esperado, aparentemente ocorreu a liberação de animais para a natureza, e desde então a expansão numérica e geográfica da população é constante (THIENGO et al., 2007; FISCHER, COSTA, 2010). Hoje esse molusco está distribuído em 25 dos 26 estados brasileiros mais o Distrito Federal (THIENGO et al., 2013).

No estado da Bahia esses caramujos já foram registrados nos municípios de Salvador (SILVA, ALELUIA, 2010), Lauro de Freitas (ALBUQUERQUE et al., 2003), Ilhéus (SANTOS, DELABIE, 2011; CARVALHO et al., 2012) e Jequié (JÚNIOR, 2009).

Esses animais possuem uma forte interação com os fatores abióticos e bióticos que são indispensáveis para a sua sobrevivência. Fatores como temperatura, a umidade relativa do ar e precipitação, regulam a atividade desses moluscos (COSTA, 2010). Segundo Raut e Barker (2002) esses gastrópodes são ativos em períodos chuvosos, e quando a umidade relativa do ar está acima de 50%. Mudanças bruscas de temperatura e umidade podem induzir a hibernação e a estivação nesses animais, sendo estas excelentes estratégias

para a colonização e recolonização de ambientes após condições estressantes naturais ou causadas pelo homem (FISCHER, AMADIGI, 2010). Segundo Albuquerque et al. (2009) as variáveis ambientais e a densidade humana podem influenciar no comprimento concha, no peso total e no fator de condição.

O fator de condição expressa a relação entre o peso e comprimento, sendo possível estimar através desse índice os aspectos comportamentais das espécies e verificar a influência de fatores bióticos e abióticos (VAZZOLER, 1996). Desta forma, o fator de condição serve para avaliar a qualidade do habitat onde vive essas espécies, e analisar o bem-estar da população (LE CREN, 1965; RICKER, 1975; BOLGER, CONNOLLY, 1989). Este mesmo fator também reflete as mudanças fisiológicas do caracol, principalmente durante a estivação e períodos de baixa umidade (VINCI et al, 1998; ALBERTONI et al, 2003). Segundo Albuquerque et al. (2009) entender os fatores que governam o comprimento e o peso, e o fator de condição, pode ser uma ferramenta útil para o manejo de espécies invasoras, principalmente em regiões onde há uma escassez de dados.

O molusco *A. fulica* é comumente encontrada em ambientes antropúrgicos, devido à disponibilidade de alimentos, abrigos e menor exposição a predadores (SIMIÃO, FISCHER, 2004). Segundo Fischer et al. (2003) esses gastrópodes possuem preferência por resíduos orgânicos, cuja disponibilidade é exacerbada no ambiente urbano. Além disso, as áreas urbanas oferecem mais substratos, favorecendo a fixação de mais indivíduos e aumentando o recrutamento dos filhotes, e assim nessas áreas é mais frequente a presença de filhotes e animais jovens. Os substratos também amenizam as condições adversas, aumentando a taxa de sobrevivência (FISCHER et al., 2010). O encontro dessa espécie na área urbana coloca em alerta as autoridades de saúde pública, pois este animal tem um potencial transmissor de agentes de doenças como a angiostrongilose e por serem vetores de outros agentes zoonóticos (FISCHER, COSTA, 2010).

Desta forma, é necessário esclarecer a relação de *A. fulica* com o meio ambiente para que se possa determinar o real impacto da sua invasão e assim impedir novas introduções, além de estimar ou diagnosticar os danos econômicos, ecológicos e à saúde

humana e animal que o caramujo africano pode causar. Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar a presença e avaliar o grau de desenvolvimento de *A. fulica* no município de Feira de Santana - Bahia, bem como relacionar variáveis morfológicas, incluindo o fator de condição relativo, às variáveis climáticas.

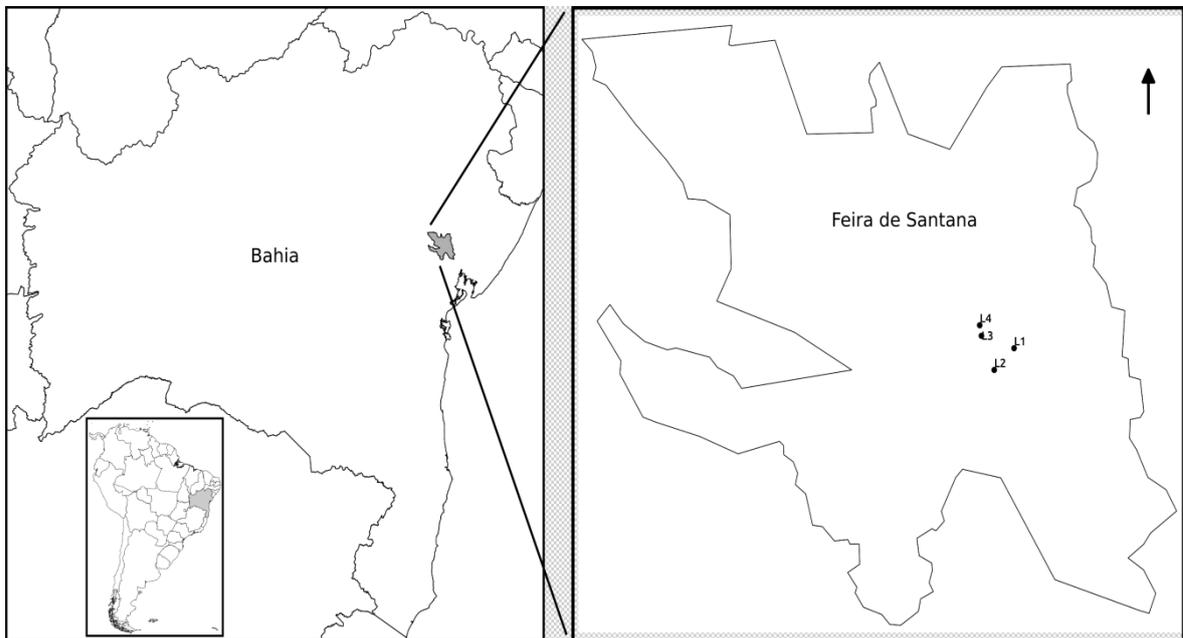
Material e Métodos

O estudo foi realizado no município Feira de Santana ($12^{\circ}16''S$ e $38^{\circ}58'O$), Estado da Bahia, situado a 107 km de Salvador, à qual se liga pela rodovia BR-324. Feira de Santana possui uma área de 1.364Km^2 , estando localizado na zona de planície entre o Recôncavo Baiano e os tabuleiros semi-áridos do nordeste baiano. Apresenta uma população de 562.466 habitantes, com densidade demográfica de $416,03\text{ hab/Km}^2$ (BRASIL, 2011).

O clima do município de Feira de Santana é complexo por esta inserido numa zona de transição entre os domínios quentes úmido, caracterizados por florestas pluviais e o domínio de zona tropical, com estação seca definida. O índice pluviométrico médio anual é de 802 mm sendo o período de maior pluviosidade nos meses de março a maio com média máxima de 144mm no mês de maio. Os menores índices pluviométricos estão entre os meses de agosto a outubro. Nos meses de novembro a janeiro é marcado pelas trovoadas, com chuvas esporádicas concentradas. A posição geográfica de baixa latitude garante para Feira de Santana a incidência durante todo o ano de forte radiação solar e elevadas temperaturas. A temperatura média anual é de 24°C , sendo que o período quente concentra-se nos meses de outubro a janeiro, cuja média térmica ultrapassa os 30°C . As menores temperaturas são registradas nos meses de junho a agosto com temperatura de 20°C a 23° (CEPLAC, 1975).

Entre o período de janeiro a junho de 2013 foram realizadas coletas a partir de quatro áreas no perímetro urbano do município: L1 ($12^{\circ}13'0,5''S$ e $038^{\circ}56'42,9''O$), L2 ($12^{\circ}13'57,5''S$ e $038^{\circ}57'41,1''O$), L3 ($12^{\circ}12'28,0''S$ e $038^{\circ}58'18,6''O$) e o L4 ($12^{\circ}12'00,3''S$ e $038^{\circ}58'23,6''O$) (Figura 1).

Figura 1. Localização do Município de Feira de Santana e os pontos de coleta de espécimes de *Achatina fulica*. Feira de Santana, 2013.



Na área L1 os animais foram encontrados nas proximidades de uma lagoa, incluindo assim áreas dotadas de cobertura vegetal, lixo, esgoto e a presença constante de animais domésticos, sendo os locais de coleta representados por terrenos baldios (Figura 2A). Na área L2 estes moluscos foram encontrados em uma praça dotada de cobertura vegetal e presença de resíduos orgânicos (Figura 2B). Na área L3 foram feitas visitas em quintais e terrenos baldios próximos as residências, e nesses locais havia lixo, entulhos e animais (Figura 2C). Na área L4 as coletas foram realizadas em terrenos cuja vegetação era composta por gramíneas, arbustos e havia pequena quantidade de lixo e entulhos, no entanto, com a presença de muitos animais, principalmente gatos e cachorros (Figura 2D).

Figura 2. Pontos de coleta de espécimes de *Achatina fulica* em Feira de Santana, BA. 2013. A – L1, B – L2, C – L3, D – L4.



Os moluscos foram coletados manualmente, com as mãos protegidas por luvas de borracha, no início da manhã, através de um esforço de captura praticado por homem/hora nas áreas de coleta. Os indivíduos coletados foram acondicionados em caixas isotérmicas com tampa adaptada para permitir a aeração. Após cada coleta os espécimes foram transportados ao Laboratório do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública da Universidade Estadual de Feira de Santana.

No laboratório os animais foram lavados em água corrente e mensurados o comprimento total da concha (Ct), usando um paquímetro com precisão de 0,1 mm, e a massa total da concha (Pt) com a parte mole, em balança digital com precisão de 0,01g. O estágio de desenvolvimento foi determinado segundo a classificação de Tomiyama (2002) que considera juvenis os caramujos com conchas de 10 a 40 mm; jovens os indivíduos com conchas de 41 a 90 mm e adultos aqueles com conchas acima de 90 mm de comprimento.

Os dados climáticos para cada dia de coleta (temperatura média, umidade relativa e precipitação) (Tabela 1) foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (BRASIL, 2013).

A relação entre a massa total (Pt) e comprimento (Ct) foi utilizada para ajustar a curva de relação alométrica, determinando-se os valores a e b, que foram utilizados para se calcular a massa esperada (Pt-e) e o fator de condição relativo (Kn), a partir da expressão: $Kn = Pt/Pt-e$ (VELLOSO, PEREIRA JÚNIOR, 2010). O fator de condição aponta crescimento isométrico quando $b=3$, alométrico positivo quando $b>3$ ou alométrico negativo quando $b<3$ (LIMA-JUNIOR et al, 2002).

A associação entre as variáveis climáticas e variáveis morfométricas, incluindo o fator de condição relativo foi verificada pela regressão linear simples. Os dados relativos às dimensões corporais (comprimento da concha) e os locais de coleta foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) e o Epi Info 7 (DEAN et al., 2011), considerando-se significativos os valores de $P < 0,05$.

A pesquisa foi realizada de acordo com a legislação, possuindo licença para captura, transporte, e manutenção dos animais cedida pelo IBAMA (nº da autorização/licença: 35442 – Anexo A).

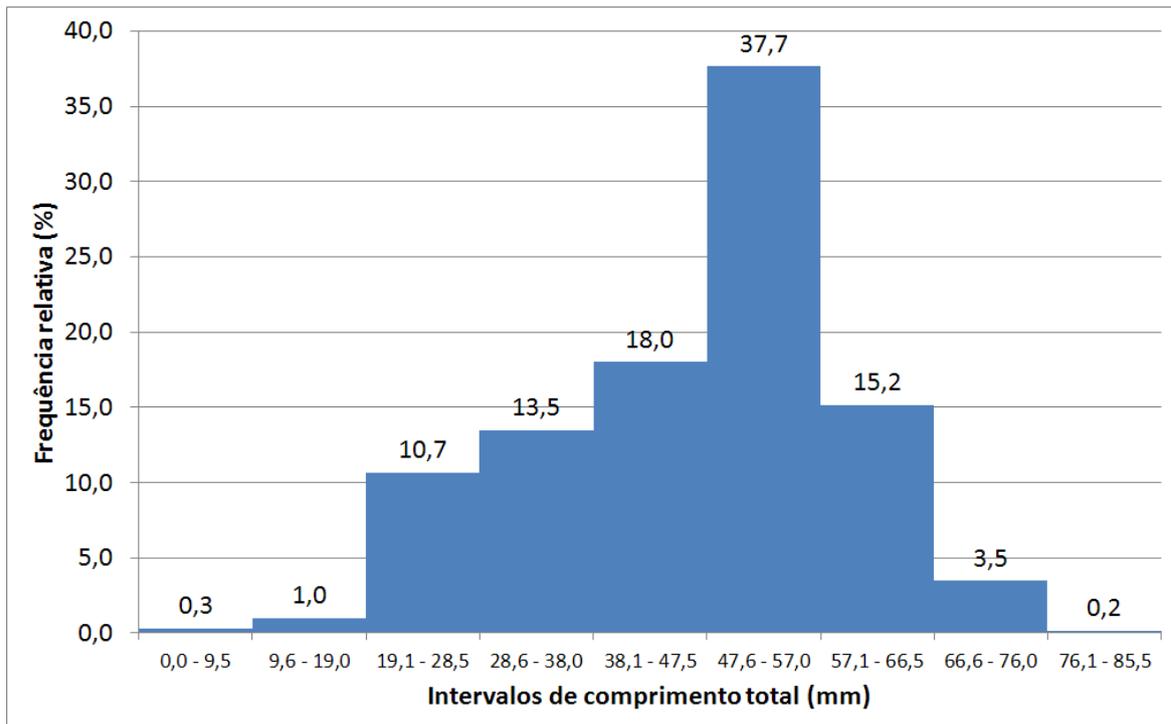
Resultados e Discussão

Os dados do presente trabalho constituem-se o primeiro levantamento para a caracterização da população e para o diagnóstico da ocupação de *A. fulica* em Feira de Santana, Bahia. Em um período curto de coleta, que ocorreu entre janeiro a junho de 2013, foi possível avaliar a ocorrência desses animais no ambiente urbano, o grau de desenvolvimento da população e as suas relações com as variáveis ambientais.

As vistorias feitas mensalmente resultaram na coleta de 600 caramujos. Durante o estudo foi observado que a maioria dos animais coletados apresentou um comprimento de

concha entre 47,6-57,0mm (Figura 3). Em relação ao comprimento da concha estudos anteriores realizados no município de Lauro de Freitas (BA) por Albuquerque et al. (2009) e em Salvador (BA) por Silva et al. (2010) encontram a maioria dos caramujos com comprimento de concha entre 32,9-39,5mm e 41-60mm respectivamente.

Figura 3. Histograma da frequência relativa de espécimes de *Achatina fulica* segundo o comprimento total da concha (em mm). Feira de Santana, 2013.



A tabela 1 apresenta a mediana dos dados morfométricos de *A. fulica* e as variáveis climáticas, segundo a coleta, mês e local de coleta. Durante as idas a campo foi observado que houve pequena variação de temperatura no município. Segundo Diniz et al.(2008) o município de Feira de Santana se encontra em uma zona climática intermediária entre a zona úmida do litoral e a semi-aridez das áreas mais interioranas, fator que favorece a ocorrência de *A. fulica* neste município. Segundo o INMET a temperatura máxima e mínima no período foi de 29,5°C e 20°C e a umidade foi de 95% e 30% respectivamente. Segundo Albuquerque et al. (2003) a temperatura é um dos fatores que favorecem a permanência dos animais no ambiente. Além disso, para Raut e Barker (2002), as espécies pertencentes à família Achatinidae ocorrem em climas úmidos, tropicais e subtropicais.

Takeuchi (1991) relatou que a atividade de *A. fulica* varia sazonalmente, mostrando que em período seco, os indivíduos estivam. Em períodos extremos de temperatura podem ocorrer dessecação (VINCINI, 1988). Tais fatores pode explicar a ausência de animais nas coletas 3, 8, 10 e 11 (Tabela 1). Durante essas coletas houve baixa precipitação e menor umidade, embora na coleta 3 a umidade relativa dor ar foi de 95%, mas a precipitação foi baixa. Segundo Raut (2002) há uma forte correlação entre a umidade e precipitação, no que se refere ao encontro destes animais no campo, ficando suas atividades restritas a períodos chuvosos, permanecendo inativas durante o período de estiagem.

Na análise entre as variáveis morfométricas e climáticas não encontramos uma correlação significativa (Tabela 2). Albuquerque et al. (2003) constataram que a umidade foi a variável principal que influenciou no tamanho da concha. De acordo com Raut e Baker (2002) *A. fulica* pode sobreviver a temperatura ótima em torno de 26°C, máxima de 45°C e mínima de 9°C. Além disso, a umidade relativa do ar parece ser um fator mais crítico que a temperatura (FISCHER et al., 2010). Ainda segundo esses autores, o processo de estivação acontece na estação seca ou abaixo de 10°C, no entanto existem registros de limites para atividade como 28-30°C e 80-82% de umidade relativa do ar.

Tabela 1. Coleta, mês, local de coleta, temperatura (°C), umidade relativa (%), índice pluviométrico (mm), número de animais coletados, mediana do comprimento total (Ct) em cm, mediana da massa corporal (m) em gramas e mediana do fator de condição relativo (Kn) para *Achatina fulica*, coletados em Feira de Santana no período de janeiro a junho de 2013.

Coleta	Mês	Local de coleta	T (°C)	U (%)	P (mm)	n	Ct (mm)	m (g)	Kn
1	JAN	L4	27,4	35	0,0	48	36,0	9,2	1,02
2	JAN	L4	29,3	74	10,0	79	29,0	5,2	0,98
3	JAN	L3	26,8	91	0,0	0	-	-	-
4	FEV	L2	27,3	73	0,0	10	45,0	11,8	0,83
5	FEV	L1	26,7	74	0,0	31	42,0	12,5	1,02
6	FEV	L3	20,0	60	0,2	3	25,0	3,6	1,03
7	MAR	L2	28,4	65	0,0	5	58,0	26,3	1,00
8	MAR	L2	27,8	68	0,0	0	-	-	-
9	MAR	L1	29,4	65	0,0	42	54,0	25,4	1,14
10	MAR	L3	27,4	64	0,0	0	-	-	-
11	MAR	L4	29,4	65	0,0	0	-	-	-
12	ABR	L2	27,8	68	0,0	4	47,0	8,5	0,59
13	ABR	L3	26,8	68	0,0	3	71,0	45,4	1,05
14	ABR	L1	28,5	71	0,0	21	51,0	18,1	0,94
15	ABR	L4	22,5	93	12,5	9	41,0	10,8	0,90
16	MAI	L2	29,5	57	0,0	76	49,0	18,3	0,98
17	MAI	L3	25,7	95	5,0	2	63,0	33,4	1,07
18	MAI	L1	24,1	90	1,8	64	54,5	20,0	0,90
19	MAI	L3	24,7	82	0,0	8	65,5	32,2	1,08
20	JUN	L2	25,9	85	0,0	84	50,5	18,4	0,94
21	JUN	L1	24,1	90	1,8	3	55,0	24,6	1,11
22	JUN	L1	24,5	87	1,0	77	51,0	20,0	1,03
23	JUN	L3	27,1	71	0,0	31	50,0	19,3	0,99

Tabela 2. Coeficientes de correlação e valores de P associados entre variáveis climáticas, comprimento total da concha (mm), massa (g) e fator de condição relativo de *Achatina fulica*. Feira de Santana, 2013.

Variáveis climáticas	Comprimento total da concha (mm)		Massa (g)		Fator de condição	
	r	Valor de P	r	Valor de P	R	Valor de P
Temperatura	-0,07	0,7861	-0,07	0,7600	-0,20	0,4234
Umidade	0,27	0,2547	0,26	0,2742	-0,23	0,3406
Precipitação	-0,12	0,6210	-0,10	0,6688	-0,18	0,4449

Na área L4 foram encontrados os animais de menor tamanho ($36,2 \pm 13,4$ mm), e nas áreas L1, os maiores ($50,2 \pm 11,8$ mm), seguido por L3 ($50,0 \pm 14,9$ mm) e L2 ($49,2 \pm 8,3$ mm), sendo estes últimos resultados diferem ($P < 0,05$) daqueles encontrados em L4 (Tabela 3). Nos locais L1, L2 e L3 os animais foram encontrados em cobertura vegetal, lixo orgânico e em fezes de animais domésticos, havendo nesses locais falta de limpeza pública, o que pode ter favorecido a manutenção e o crescimento desses animais. Segundo Fischer et al. (2010), o encontro de lixo em abundância nos locais onde esses animais foram coletados resulta em abrigo e alimento de fácil processamento, e em áreas urbanas incrementa o horário de forrageamento, o que torna um determinante para o aumento da velocidade de crescimento.

Tabela 3. Estatísticas descritivas para o comprimento total da concha de *Achatina fulica* segundo o local de coleta. Feira de Santana, 2013.

Locais de coleta	Número de animais coletados	Comprimento total da concha	
		Média \pm desvio-padrão	Mediana (P25 - P75)
L1	235	$50,2 \pm 11,8^a$	52,0(44,0 – 59,0) ^a
L2	179	$49,2 \pm 8,3^a$	50,0(46,0 – 54,0) ^a
L3	47	$50,0 \pm 14,9^a$	53,0(42,0 – 58,0) ^a
L4	139	$36,2 \pm 13,4^b$	32,0 (27,0 – 42,0) ^b

Estatísticas: Valores de mediana seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os locais de coleta pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Em L4 freqüentemente são feitas limpezas nos terrenos, com a retirada da vegetação, do lixo orgânico e entulhos. Isto pode explicar o menor tamanho dos animais

nesse local, que depende dessas condições para o deslocamento eficiente, o refúgio e a reprodução.

A análise dos estágios de desenvolvimento etário de *A. fulica*, baseada no comprimento total dos animais, demonstrou que as classes de tamanho apresentaram um número maior caramujos na fase juvenis e jovens (Tabela 5). Esse resultado corrobora os achados de Fischer, Colley (2004, 2005), Simião, Fischer (2004), Oliveira et al. (2013), Dourado et al. (2009) e Silva et al.(2010), que estudando populações de *Achatina fulica* em zonas antropúrgicas, encontraram maior número de animais juvenis e jovens, em detrimento de adultos. Segundo Fischer, Colley (2004, 2005) e Simião, Fischer (2004), os ambientes alterados pelo homem oferecem mais substratos que favorecem a instalação desses animais.

Nesse estudo não encontramos caramujos na fase adulta o que diferem dos registros de Fischer et al. (2006), que em populações presentes em áreas de matas nativas, encontraram uma população majoritária de caramujos adultos. Esses mesmos autores sugerem que os caramujos adultos presentes nessas áreas se constituem de uma população recente, pelo fato da saturação de ambiente antropúrgicos, recomendando a necessidade de medidas para redução da população desses animais em áreas urbanas.

O estabelecimento de *Achatina fulica* em novas áreas passa por três fases: exponencial, caracterizada por apresentar uma população de indivíduos grandes e vigorosos; a segunda trata de uma população com duração variável, aumento populacional e homozigose, e a última a fase de declínio, onde há uma prevalência de indivíduos jovens (CIVEYREL, SIMBERLOFF, 1996). De acordo com o nosso estudo, a população de *A. fulica* em Feira de Santana está atualmente na última fase, o que caracteriza uma população em declínio formada por indivíduos jovens e juvenis de acordo com a classificação de Tomiyama (2002). No entanto, este declínio populacional não expressa que a população de *A. fulica* está em vias de controle no município tendo em vista a rápida dispersão e disseminação dessa espécie exótica em áreas urbanas e periurbanas, podendo representar apenas a condição encontrada nos locais de amostragem.

Tabela 4. Frequência absoluta (n) e relativa (%) de *Achatina fulica*, segundo o estágio de desenvolvimento e o local de coleta. Feira de Santana, 2013.

Local de coleta	ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO				TOTAL
	Juvenis		Jovem		
	N	%	N	%	
L1	41	17,4	194	82,6	235
L2	18	10,1	161	89,9	179
L3	11	23,4	36	76,6	47
L4	100	71,9	39	28,1	139
TOTAL	170	28,3	430	71,7	600

A relação entre comprimento total e a massa corporal total dos espécimes coletados apresentou um crescimento alométrico negativo para os seis meses de coleta, com $b=2,3014$ e $r^2=0,9297$, ou seja, o crescimento é maior em comprimento do que em peso. Quando $b > 3$ o crescimento é alométrico positivo, onde o crescimento em peso é maior do que em comprimento e $b=3$, o crescimento é isométrico, ocorrendo de forma simétrica entre o peso e o comprimento (ARAÚJO et al., 2011). A equação alométrica foi $Mt=0,0023.Ct^{2,3014}$ (Figura 4), com variações significativas pontuais do fator de condição relativo durante os seis meses avaliados (Figura 5). Nosso resultado corrobora os resultados de Albuquerque et al. (2009), que também encontrou um crescimento alométrico negativo em espécimes coletadas no município de Lauro de Freitas (BA). Segundo esses mesmos autores o crescimento alométrico negativo pode afetar no comprimento máximo de concha e, conseqüentemente no seu peso.

Quando calculados os valores de b para cada ponto de coleta, verifica-se que $b=2,54$, $b=2,38$, $b=2,22$ e $b=2,06$ para L3, L1, L4 e L2 respectivamente. As populações de *A. fulica* da área L4 apresentou valores de b próximo e significamente menor que 3, enquanto que nas áreas L3, L1 e L4 apresentaram um valor maior e próximo de 3. O valor 3 teoricamente representaria o crescimento isométrico em situações fisiologicamente adequadas. As diferenças destes valores entre as áreas L1, L2, L3 e L4 podem ser devida as condições ambientais diferenciadas. Nas áreas L1, L2 e L3 possui altas concentrações de

resíduos orgânicos, restos de construção civil e vegetação e, portanto, oferecem abrigos e alimentos para os caramujos. Em L4, por outro lado, não havia presença de lixo orgânico e entulhos, portanto, não havia condições adequadas para a manutenção e sobrevivência dos caramujos. Esta variação não foi acompanhada por uma diferença significativa dos valores medianos do fator de condição entre os pontos de coleta.

Figura 4. Relação alométrica entre a massa corporal (em gramas) de *Achatina fulica* pelo comprimento total da concha (em mm). Feira de Santana, 2013.

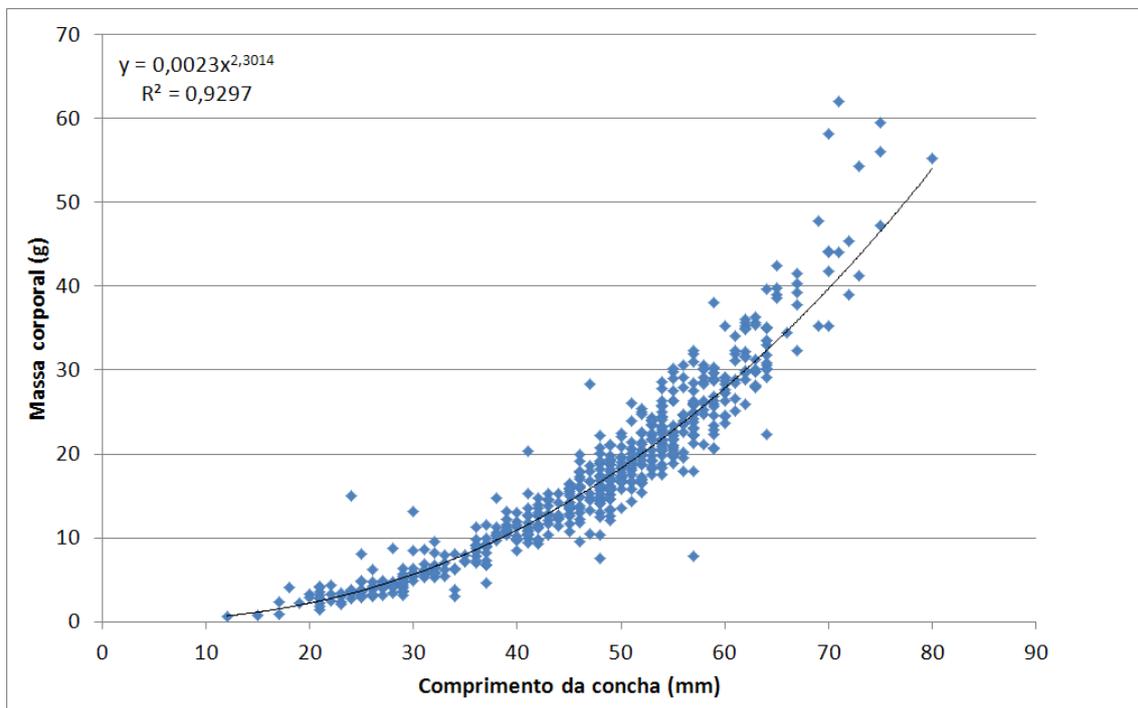
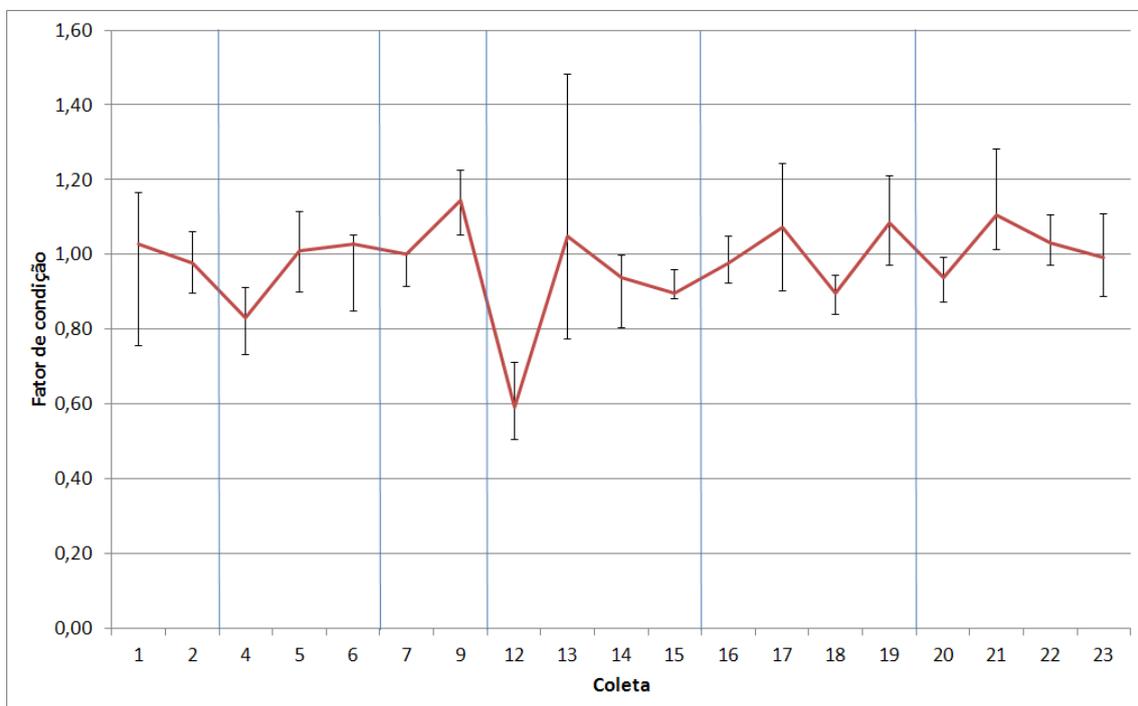


Figura 5. Fator de condição mediano para *Achatina fulica* em 23 coletas realizadas de janeiro a junho de 2013. As barras indicam os percentis 25 e 75. Feira de Santana, 2013.



O fator de condição reflete o estado fisiológico do caramujo, especialmente no período de estivação e de baixa umidade (VINCI et al, 1998; ALBERTONI et al., 2003). Em nosso estudo o fator de condição apresentou variações pontuais ao longo dos seis meses de coleta. Por outro lado, no estudo de Albulquerque et al. (2009), esse índice esteve correlacionado com a faixa de temperatura e a densidade humana. No estudo destes autores, não ocorreu mudanças drásticas na temperatura média e umidade relativa do ar, mostrando que condições climáticas estáveis são importantes para o desenvolvimento e bem-estar do molusco.

Esse é o primeiro estudo sistemático da ocorrência do molusco *A. fulica* no município de Feira de Santana (BA). Além disso, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a população desse molusco está em declínio nos pontos de coleta estudados, devido à grande quantidade de indivíduos juvenis e jovens.

É necessário que a vigilância sanitária e de saúde pública do município fiquem atentos para o controle adequado dessa espécie. Medidas como conscientização ambiental da população, limpeza de terrenos baldios, a retirada de lixos e entulhos, e a catação manual dos moluscos e sua posterior incineração, devem ser tomadas para evitar a dispersão desse gastrópode no município.

Conclusões

1. *Achatina fulica* ocorre em Feira de Santana (BA), com a totalidade dos espécimes avaliados representados por indivíduos juvenis e jovens, caracterizando uma população em declínio nas áreas de coleta;
2. Não foram encontradas relações entre as variáveis morfométricas e climáticas;
3. Os espécimes estudados no período de seis meses de coleta apresentaram crescimento alométrico negativo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia-LAPEM (UEFS) pelo suporte físico, a FAPESB, CAPES e CNPq pela concessão de bolsas de estudo e apoio financeiro. Ainda agradecemos aos funcionários e estagiários do Laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia- UEFS e a equipe do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública-UEFS pelo suporte na fase experimental.

Referências

- ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F.A. Overlap of dietary niche and electivity of three shrimp species (Crustacea: Decapoda) in a tropical coastal lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n.1, p. 135-140, 2003.
- ALBUQUERQUE, F.S. **Ocorrência, aspectos da dinâmica populacional e comportamental de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Gastropoda: Pulmonata) em Lauro de Freitas, Bahia**. 2003.100 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento), Universidade Federal da Bahia, 2003.
- ALBUQUERQUE, F.S.; PESO-AGUIAR, M.C.; ASSUNÇÃO-ALBUQUERQUE, M.J.T.; GÁLVEZ, L. Do climate variables and human density affect *Achatina fulica* (Bowdich) (Gastropoda: Pulmonata) shell length, total weight and condition factor? **Brazilian Journal of Biology**, v. 3, n.69, p. 879-885, 2009.
- ALOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S. **100 of the world's worst invasive alien species**. A selection from the global invasiv species data base. 2004. Disponível em: <www.issg.org/database>. Acesso em: 20 maio 2013.
- ARAÚJO, C.C.; FLYNN, M.N.; PEREIRA, W.R.L. Fator de condição e relação peso-comprimento de *mugilcurema* valenciennes, 1936 (pisces, mugilidae) como indicadores de estresse ambiental. **Revista Intertox de toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n. 3, p.51-64, 2011.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007. 364p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/> Acesso em: 18 de janeiro de 2013.
- BOLGER, T.; CONNOLLY, P.L. Selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. **Journal of Fish Biology**, v. 34, n.1, p. 71-182, 1989.

- CARVALHO, O.S.; SCHOLTE, R.G.C.; MENDONÇA, C.L.F.; PASSOS, L.K.J.; CALDEIRA, R.L. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbor areas in Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.6, p. 740-746, 2012.
- CEPLAC/ CEI/ SEPLANTEC. **Atlas climatológico do Estado da Bahia** - vol.3. Balanço hídrico, Salvador, 1975.
- CIVEYREL, L.; SIMBERLOFF, D. A tale of two snails: is the cure worse than the disease? **Biodiversity and Conservation**, v. 5, n.2, p. 1231-1252, 1996.
- CORADIN, L.; TORTATO, D. T. **Espécies exóticas invasoras: situação brasileira**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2006. 24 p.
- COSTA, L.C.M. Comportamento da *Achatina fulica*. In: FISCHER, M.L.; COSTA, L.C.M. (Org (s)). **Caramujo gigante *Achatina fulica* no Brasil**. Curitiba: Ed. Champagnat, 2010. p. 141-174.
- DEAN, A, G.; ARNER, T. G.; SUNKI, G.G.; FRIEDMAN, R.; LANTINGA, M.; SANGAM, S.; ZUBIETA J. C.; SULLIVAN, K. M.; BRENDEL, K.A.; GAO, Z.; FONTAINE, N.; SHU, M.; FULLER, G.; SMITH, D.C.; NITSCHKE, D.A.; FAGAN, R.F. **Epi Info™, a database and statistics program for public health professionals**. CDC, Atlanta, GA, USA, 2011.
- DINIZ, A.F.; SANTOS, R.L.; SANTO, S.M. Avaliação dos riscos de seca para o município de Feira de Santana- BA associado à influência do El niño no semi-árido do Nordeste Brasileiro. + **Geografia's**, v.1, n.1, p.18-24, 2008.
- DOUDORADO, E.A.S.; ROSÁRIO, N.A.; BOCCARDO, L. Ocorrência de *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinidae) no bairro Jequezinho, Jequié, Bahia, Brasil. Em: IX Congresso de Ecologia do Brasil, 2009, São Lourenço. IX Congresso de Ecologia do Brasil. São Paulo: SEB, 2009.
- FISCHER, M.L.; COLLEY, E. Diagnóstico da ocorrência do caramujo gigante africano *Achatina fulica* Bowdich, 1822 na APA de Guaraqueçaba. **Estudos de Biologia**, v.26, n.54, p.43-50, 2004.
- FISCHER, M.L.; COLLEY, E. Espécie insavora em reservas naturais: Caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca- Achatinidae) na ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, n.1, p. 127-144, 2005.
- FISCHER, M.L.; AMADIGI, I.S.N. História natural da *Achatina fulica*. In: FISCHER, M.L.; COSTA, L.C.M. (Org (s)). **Caramujo gigante *Achatina fulica* no Brasil**. Curitiba: Ed. Champagnat, 2010. p. 49-99.
- FISCHER, M.L.; COSTA, L.M.F. Apresentação. In: FISCHER, M.L.; COSTA, L.C.M. (Org (s)). **Caramujo Gigante *Achatina fulica* no Brasil**. Curitiba: Ed. Champagnat, 2010. p. 9-11

- LE CREN, E. The length – weight relation and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch, *Perca fluviatilis*. **Journal of Animal Ecology**, v. 20, n.2, p. 201-219, 1951.
- OLIVEIRA, J. C.S.; CORRÊA, K.J.G.; VASCONCELLOS, 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.
- RAUT, S. K.; BARKER, G.M. *Achatina fulica* Bowdich and others Achatinidae pest in tropical agriculture. In: BARKER, G. (Org). **Mollusks as croup pest**. New Zealand: CAB Publishing, 2002. p. 55-114.
- RICKER, W. Computation and interpretation of biological statistics fish populations. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 191, n.10, p. 382, 1975.
- SANTOS, J.R.M.; DELABIE, J.H.C. Controle de *Achatina fulica* (Mollusca, Gastropoda) por *Ocypoda quadrata* (Crustacea, Decapoda) em restinga antropizada de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Sítientibus série Ciências Biológicas**, v. 11, n.1, p. 94-98, 2011.
- SILVA, E.C.; ALELUIA, F.T.F. Ocorrência de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) em Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Zociências**, v. 12, n. 2, p.199-204, 2010.
- SIMIÃO, M.S.; FISCHER, M.L. Estimativa e inferências do método de controle do molusco exótico *Achatina fulica* no Pontal do Paraná, Litoral do Estado do Paraná. **Cadernos de Biodiversidade**, v. 4, n. 2, p. 74-83, 2004.
- TAKEUCHI, K.; KOYANO, S.; NAMAZAWA, K. Occurrence of the giant african snail in Ogasawara Islands, Japan. **Micronesica**, v. 4, n. 3, p. 109-116, 1991.
- THIENGO, S.C.; FARACO, F.A.; 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 Brazil. **Biologica Invasions**, v. 9, n. 6, p. 693-702, 2007.
- THIENGO, S.C.; SIMÕES, O.R.; FERNANDEZ, M.A.; MALDONADO-JÚNIOR, A. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. **Journal of medicine & public health**, v.72, n.6, p.18-22, 2013.
- TOMIYAMA, K. Age dependency of sexual role and reproductive ecology in a simultaneously hermaphroditic land snail, *Achatina fulica* (Stylommatophora: Achatinidae). **Venus**, v. 60, n. 4, p. 273-283, 2002.
- VASCONCELLOS, M.C.; PILE E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 6, p. 582-584, 2001.
- VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM. 1996, 196 p.

VELLOSO, A.L.; PEREIRA JÚNIOR, J. Influence of ectoparasitism on the welfare of *Micropogonias furnieri*. ***Aquaculture***, v. 310, n. 2, p. 43-46, 2010.

VINCINI, G.K; UNNITHAN, V.K; SUGUNAN, V.V. Farming of the giant african snail, *Achatina fulica*. **Central Island Capture Fisheries Research Institute**, v.56, n. 8, p. 1-24, 1998.

NEMATÓDEOS EM *Achatina fulica* BOWDICH, 1822 (GASTROPODA: PULMONATA) DA ÁREA URBANA DO MUNICÍPIO DE FEIRA SANTANA (BA).

Patrícia Hercília Arcanjo de Almeida⁴, Sofia Aline Amaral Santos⁵, Aristeu Vieira da Silva⁶

Resumo

O gastrópode *Achatina fulica* é nativo do oeste africano e se tornou um sério problema ambiental e econômico onde foi introduzido. É também um problema de saúde pública, devido à capacidade de ser hospedeiro intermediário de nematódeos. Com isso o objetivo desse trabalho foi verificar a frequência de larvas de nematóides em *A. fulica* provenientes do município de Feira de Santana, Bahia, a associação desta frequência a variáveis climáticas e epidemiológicas, e sua influência sobre o fator de condição relativo. De maio de 2012 a junho de 2013 foram coletados *A. fulica* de oito áreas no perímetro urbano do município. Os animais foram coletados no início da manhã e transportados para o laboratório do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública-UEFS. Durante o período de coleta também foram feitas observações sobre os locais de coleta. As variáveis climáticas foram disponibilizadas pelo Instituto Nacional de Meteorologia. No laboratório os animais foram lavados em água corrente e mensurados. Em seguida foram acondicionados em frascos plásticos e alimentados todos os dias com água e folhas de repolho (*Brassica olerace var. capitata*), até o processamento das amostras. As folhas de repolho foram submetidas a exames parasitológicos para detectar a presença de protozoários e helmintos. Cada molusco foi analisado individualmente utilizando a técnica de digestão artificial, com identificação das larvas encontradas. As larvas identificadas como Metastrongylidae foram submetidas à técnica de reação em cadeia pela polimerase para a identificação do gênero *Angyostrongylus*. As variáveis dependentes e independentes foram verificadas em tabelas de contingência pelos testes de χ^2 de Pearson, exato de Fischer ou G de Williams. O comprimento total da concha, a massa corporal e o fator de condição relativo foram

⁴ Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Zoologia (PPG-Zoo), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA; bolsista de Mestrado FAPESB.

⁵ Acadêmica do PPG-Zoo/UEFS, Feira de Santana, BA; bolsista de Mestrado CAPES.

⁶ Coordenador do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas (DBIO), UEFS, Feira de Santana, BA, bolsista de Produtividade em Pesquisa nível 2 CNPq.

comparados entre animais positivos e negativos para a presença de nematóides pelo teste de Mann-Whitney. Foram analisadas 220 amostras pelo método de digestão artificial, em 28 (12,7%; IC95%: 8,6-17,9) foram encontradas pelo menos um de quatro morfotipos de nematóides, incluindo os de importância médica e veterinária. Em relação à pesquisa por *Angyostrongylus*, não foram registrados tais parasitos nos caramujos examinados. Não houve associação entre as variáveis climáticas e a presença de nematóides. Tanto animais parasitados quanto não parasitados apresentaram um crescimento alométrico negativo. O fator de condição relativo não diferiu significamente entre os grupos. Este estudo reforçou o conhecimento da ocorrência de *A. fulica* no Estado da Bahia, bem como a participação desse gastrópode em ciclos biológicos de nematóides.

Palavras-chave: Caramujo gigante africano. Nematódeos. Fator de condição relativo.

Abstract

The snail *Achatina fulica* is native of West Africa and has become a serious environmental and economic problem where was introduced. It is also a public health problem, due to the ability to be intermediate host of nematodes. The objective of this research was to verify the frequency of nematode larvae in *A. fulica* from the municipality of Feira de Santana, Bahia, association of this frequency with climatic and epidemiological variables, and their influence on the relative condition factor. Thought May 2012 to June 2013 were collected *A. fulica* in eight areas in the urban perimeter of Feira de Santana. The animals were collected early in the morning and transported to the laboratory of Zoonoses and Public Health Research Group at UEFS. Data about collection sites were registered. Climatic variables were provided by the National Institute of Meteorology. In the laboratory, the animals were washed in running water and measured. Then were packed in plastic bottles and fed every day with water and leaves of cabbage (*Brassica oleracea* var. *carpitata*), until the processing of the samples. The leaves of cabbage were examined to detect the presence of protozoans and helminths. Each clam was analyzed individually using the artificial digestion technique, with identification of larvae found. The larvae have been identified as Metastrongylidae were subjected to the technique of the polymerase chain reaction for the identification of the

genus *Angyostrongylus*. Dependent and independent variables in contingency tables were verified by Pearson Chi-square tests, Fischer's exact or G Williams. The total length of the shell, body mass and relative condition factor were compared between positive and negative animals for the presence of nematodes by Mann-Whitney test. 220 samples were analyzed by the artificial digestion method, in 28 (12.7; 95: 8.6 -17.9) were encountered at least one of four morphotypes of nematodes, including these of medical and veterinary importance. *Angyostrongylus* were not found. There was no association between climatic variables and the presence of larvae. The location of collection and the size of the snail influenced in the presence of larvae. Both animals parasited as not parasitised have negative allometric growth. The relative condition factor did not differ significantly between the groups. This study has reinforced the knowledge of the occurrence of *A. fulica* in the State of Bahia, as well as the participation of this snail in biological cycles of nematodes.

Key-words: African Giant Snail. Nematode. Relative condition factor.

Introdução

O molusco *Achatina fulica* (BOWDICH, 1822), natural do continente africano, encontra-se distribuído em 25 dos 26 estados brasileiros, causando problemas econômicos e ambientais (THIENGO et al., 2013). No Brasil a sua introdução ocorreu em 1989 em uma exposição agropecuária no Paraná, como uma alternativa econômica ao tradicional *Helix aspersa* (escargot), devido ao maior volume corporal, prolificidade e rápido desenvolvimento. Devido à pouca aceitação no mercado, esses animais foram abandonados e liberados das criações, proporcionando assim a sua proliferação em áreas urbanas e nativas (TELES, FONTES, 2002; THIENGO et al., 2004; FISCHER et al., 2010).

O encontro desse gastrópode em áreas urbanas e periurbanas merece destaque, dado ao risco de transmissão dos nematóides *Angiostrongylus cantonensis* CHEN, 1935 e *Angiostrongylus costaricensis* MORERA, CÉSPEDES, 1971, causadores da meningoencefalite eosinofílica e da angiostrongilíase abdominal, respectivamente, no ser humano (SIMIÃO, FISCHER, 2004; THIENGO et al., 2007).

Os nematóides *A. cantonensis* e *A. costaricensis* são parasitos de roedores como *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 e *R. rattus* Linnaeus, 1758, e outros pequenos mamíferos, e tem em *A. fulica* um hospedeiro intermediário. O ciclo de vida das duas espécies de nematóides é similar, porém não foram observados hospedeiros paratênicos para o *A. costaricensis* (THIENGO et al., 2010). Assim, é provável que a proximidade do convívio desse gastrópode com os roedores, principalmente em áreas urbanas, seja um elemento para a dispersão do parasito (TELES, FONTES, 2002). Segundo Thiengo et al. (2010), a transmissão para os seres humanos é acidental e ocorre pela ingestão dos hospedeiros intermediários ou paratênicos, quando crus ou mal cozidos, e ainda pela ingestão de hortaliças contaminadas com o muco contendo a larva do terceiro estágio (L₃). Além dessas parasitoses este gastrópode pode atuar como hospedeiro intermediário de *Angyostrongylus vasorum* Baillet, 1866, parasito que tem como hospedeiro definitivo os cães domésticos.

Achatina fulica tem importância veterinária por estar inserida nos ciclos biológicos da fauna silvestre e doméstica do Brasil (THIENGO et al., 2007; PEREIRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2010), sendo já registrada a infecção natural por *Rhabditis* sp. Dujardin, 1844, *Strongyluris* sp. Travassos, 1923 e *Aelurostrongylus abstrusus* Raillet, 1898 (OLIVEIRA et al., 2010).

O fator de condição relativo (Kn) e o coeficiente de alometria (b) são parâmetros importantes obtidos da relação entre comprimento-peso. Esses parâmetros são essenciais para o conhecimento das condições físicas e o bem-estar de uma população. Além disso, tanto o fator de condição quanto o coeficiente de alometria são variáveis relacionadas com a presença e abundância de parasitos (TAVARES-DIAS et al, 2000; LIZAMA, 2003). Segundo Guidelli et al. (2011) este fator é importante para avaliar o estado de saúde de uma população, mas também pode ser usado para indicar os efeitos dos parasitos sobre seus hospedeiros, tanto em ambientais naturais ou em cativeiro. Frequentemente esses caramujos são parasitados, e a entrada desses parasitos no corpo do animal depende de fatores físicos e biológicos. Assim, quando esses animais são parasitados por *A. cantonensis*

ocorre destruição de tecidos, o que gera estresse interno, potencializado pelo estresse externo, como umidade excessiva, pressão de predação e estivação (FISCHER et al., 2010).

O potencial de *A. fulica* como hospedeiro intermediário de parasitos tem sido bastante investigado, mas devido à rápida distribuição dessa espécie pelo país, os estudos em algumas regiões ainda são recentes e escassos. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a frequência de larvas de nematóides em *A. fulica* provenientes do município de Feira de Santana, Bahia, a associação desta frequência a variáveis climáticas e epidemiológicas, e sua influência sobre o fator de condição.

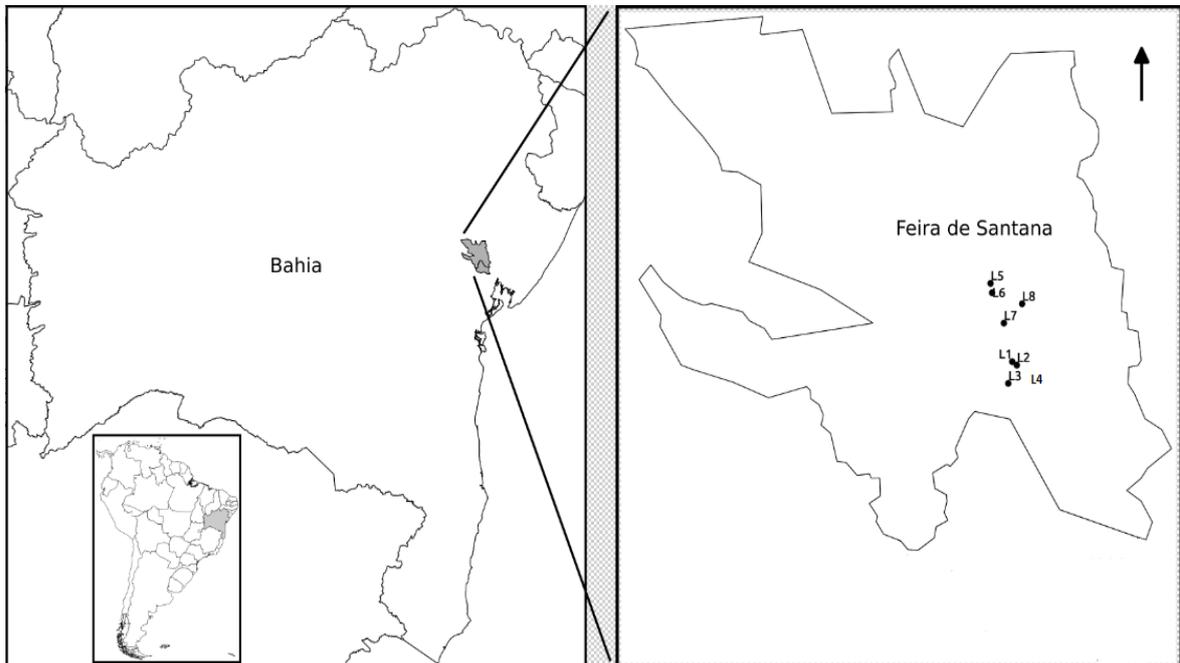
Material e Métodos

Entre maio de 2012 a junho de 2013 foram realizadas 27 coletas de *A. fulica* no município de Feira de Santana-Bahia (12°16''S e 38°58''O). Os espécimes foram coletados em oito áreas no perímetro urbano do município: L1 (12°15'50,85"S e 38°57'14,70"O), L2 (12°16'1,26"S e 38°56'59,70"O), L3 (12°16'55,18"S e 38°57'27,14"O), L4 (12°14'28,78"S e 38°56'45,98"O), L5 (12°12'00,30''S e 038°58'23,60''O), L6 (12°12'28,00''S e 038°58'18,60''O), L7 (12°13'57,50''S e 038°57'41,10''O) e L8 (12°13'0,50''S e 038°56'42,90''O) (Figura 6).

Os animais foram coletados no início da manhã, aproximadamente às cinco horas. A coleta dos moluscos foi feita manualmente com as mãos protegidas por luvas de borracha. Os caramujos encontrados foram acondicionados em caixas isotérmicas com tampa adaptada para permitir a aeração. Após cada coleta os espécimes foram transportados ao Laboratório do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública- UEFS.

Durante o período de coleta foram realizadas também observações dos locais onde os moluscos estavam presentes quanto à presença de lixo, presença de animais domésticos e presença de esgoto. Os dados climáticos (temperatura média, precipitação diária e umidade relativa) no dia das coletas foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (BRASIL, 2013).

Figura 6. Pontos de coleta de *Achatina fulica* em Feira de Santana, BA. 2012-2013.



No laboratório os animais foram lavados em água corrente e mensurados o comprimento total da concha com paquímetro (precisão de 0,1 mm), e a massa total da concha com a parte mole em balança digital (precisão de 0,01g). O estágio de desenvolvimento etário utilizado foi de acordo com a classificação de Tomiyama (2002) que considera juvenis os caramujos com conchas de 10 a 40 mm; jovens os indivíduos com conchas de 41 a 90 mm e adultos aqueles com conchas acima de 90 mm de comprimento. Os animais jovens e adultos foram separados para a pesquisa de parasitos. A relação entre comprimento total da concha e massa do molusco foi verificada pelo cálculo do fator de condição relativo (ALBUQUERQUE et al, 2009; GUIDELLI et al., 2011).

Os gastrópodes foram mantidos em frascos plásticos com tampa perfurada e alimentados todos os dias com água e folhas de repolho (*Brassica oleracea* var. *carpitata*), até a análise das amostras para a pesquisa de nematódeos. O repolho foi previamente examinado para a presença de protozoários e helmintos segundo a técnica descrita por

(SLOSS et al.1999). Nestas amostras não foram encontrados protozoários e helmintos parasitos.

Cada molusco foi analisado individualmente pelo método de Wallace, Rosen (1969) modificada por Thiengo et al. (2008). Em seguida, as amostras digeridas foram transferidas para aparato de Baermann-Moraes e deixadas em repouso por 12 horas (Moraes, 1948). Os sedimentos recolhidos foram examinados sob o microscópio estereoscópico para o estudo da morfologia e identificação, segundo Ash (1970) e Oliveira et al (2010). Após a identificação as larvas foram conservadas em álcool 70% para estudos moleculares (apêndice A).

O DNA das larvas identificadas como *Metastrongylidae* foi extraído utilizando *PureLink® Genomic DNA Kit* (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante (anexo B). Para detecção de DNA específico de *Angiostrongylus* spp. pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) foram utilizados os oligonucleotídeos LCO (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'). A escolha desses iniciadores e o protocolo utilizado foi realizado com as modificações descritas por Caldeira et al. (2003). As reações de PCR foram realizadas em volume de 50µL com 25µL *Top Taq MasterMixQiagen*, 10 pmolµL/µL de cada oligonucleotídeo, 3µL de amostra e 5,5µL de água ultra-pura estéril. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador *Master cycler epgradient Eppendorf*, constituindo de um ciclo de denaturação inicial de 5 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 50°C por 1 min, extensão a 72°C por 2 min, denaturação a 95 °C durante 45 s e uma etapa de extensão final a 72°C durante 5 min. Como controle de amplificação foi utilizado DNA extraído de *Angiostrongylus cantonensis* cepa Akita. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x, a 120 v por 45 minutos. A visualização das bandas foi realizada em transiluminador ultravioleta e o gel fotografado em sistema *L-Pix image* (versão 1.21) *Loccus* Biotecnologia.

A associação entre as variáveis dependentes e independentes foi verificada em tabelas de contingência pelos testes de χ^2 de Pearson, Exato de Fischer ou G de Williams,

utilizando-se o programa EpiInfo 7 (DEAN et al., 2011). O comprimento total da concha, a massa corporal e o fator de condição relativo foram comparados entre animais positivos e negativos para a presença de nematóides pelo teste de Mann-Whitney. Em todas as análises foram considerados significativos os valores de P menores que 0,05 (AYRES et al., 2007).

Resultados e Discussão

Este estudo registra pela primeira vez a presença de larvas de *A. abstrusus*, *Rhabditis* sp., *Strongyluris* sp. e Metastrongilídeos infectando naturalmente *A. fulica* no estado da Bahia.

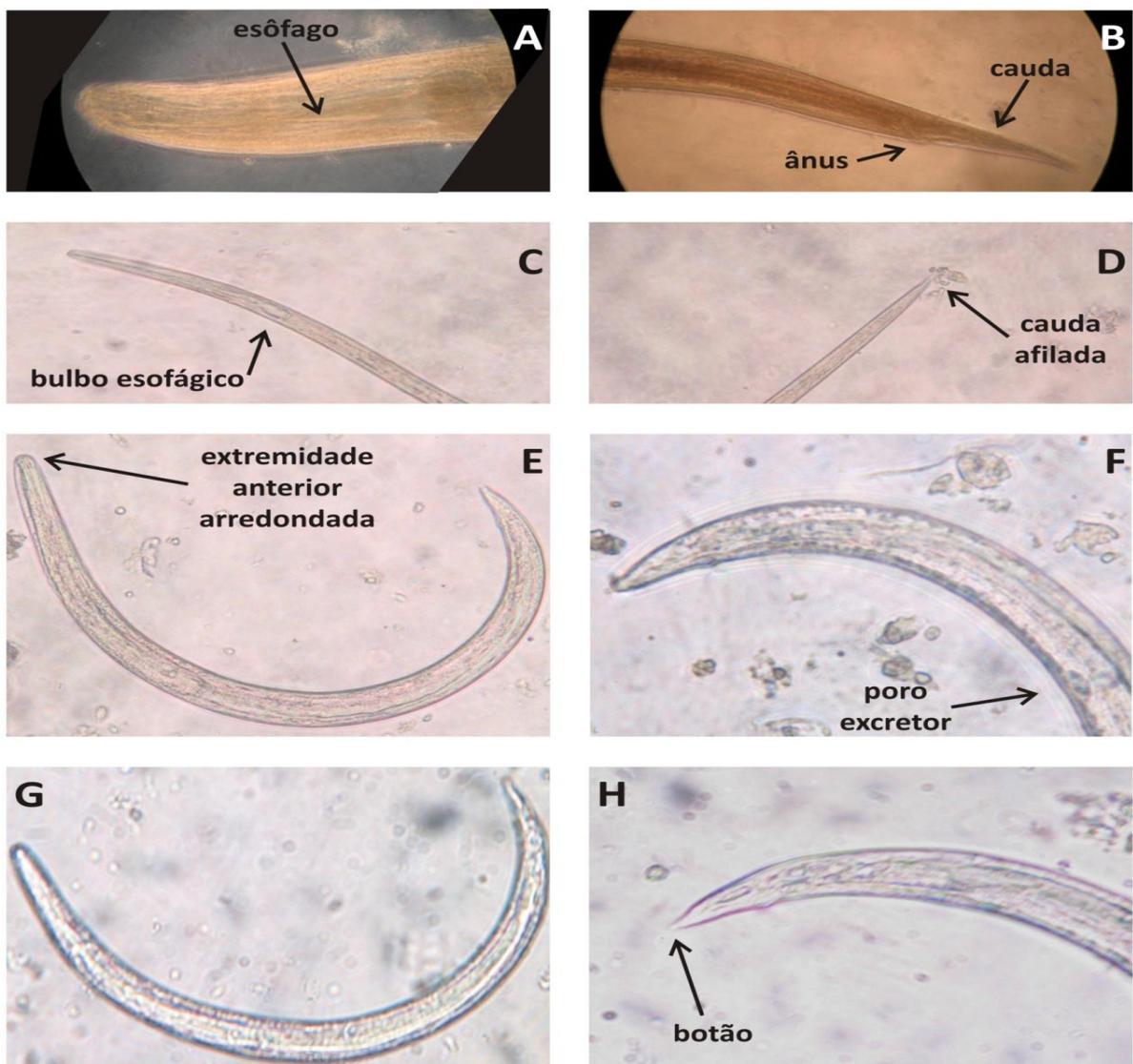
Pela análise das 220 amostras submetidas ao processo de digestão, em 28 (12,7%; IC95%: 8,6-17,9) foram encontrados pelo menos um de quatro morfotipos de nematóides, incluindo os de importância médica e veterinária (Tabela 5 e Figura 7).

Tabela 5. Frequência absoluta (N), frequência relativa (%) e intervalo de confiança 95% (IC95%) de morfotipos de Nematoda encontrados em 220 espécimes de *Achatina fulica* submetidos ao método de digestão em solução de ácido clorídrico 0,7%. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.

Morfotipo	N	%	IC95%
<i>Strongyluris</i> sp.	7	3,2	1,6 – 6,4
<i>Rhabditis</i> sp.	20	9,1	6,0 – 13,6
<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	2	1,0	0,3 – 3,2
Metastrongilídeos	6	2,7	1,3 – 5,8

Figura 7. Características morfológicas diferenciais de Nematoda encontrados em *Achatina fulica*. Feira de Santana, 2012-2013.

A) *Strongyluris* sp: região anterior indicando a presença de esôfago do tipo oxiuridiforme (x400); B) *Strongyluris* sp: região posterior apresentando a cauda curvada dorsoventralmente com ânus evidente (x400); C) *Rhabtidis* sp: região anterior indicando o esôfago constituído de pseudobulbo, istmo e bulbo (x100); D) *Rhabtidis* sp: região posterior indicando a cauda longa e afilada (x100); E) Metastrongylidae: aspecto geral da larva L3, que se apresenta curta, com aspecto de "C" e extremidade anterior arredondada (após a fixação) (x100); F) Metastrongylidae: Extremidade posterior indicando o poro excretor evidente (x100); G) *Aelurostrongylus abstrusus*: aspecto geral da larva L3 (x100); H) *A. abstrusus*: extremidade posterior evidenciando a presença de ânus e botão característico da espécie (x100).



Em um trabalho realizado também no Estado da Bahia, no município de Lauro de Freitas, região metropolitana de Salvador, por Albuquerque (2003), não foram encontrados vestígios de larvas nos indivíduos pesquisados. No entanto, há relatos de nematóides em *A. fulica* em outros estados brasileiros. Berto, Bogéa (2007) estudando vinte e duas localidades no Rio de Janeiro encontraram 4,8% das 78 *Achatina* analisadas albergando larvas de nematóides, no entanto não foi possível a identificação de gênero ou espécie dos nematóides encontrados nesse estudo, o que não permitiu a inferência com relação ao real impacto das infecções.

Em um trabalho realizado por Oliveira et al. (2010) em várias localidades do Estado de Goiás, *A. fulica* estava parasitada por *A. abstrusus*, *Rhabditis* sp., *Strongyluris* sp. e outros metastrongilídeos em 35,0%, 47,5%, 15,0% e 2,5%, respectivamente, de 184 indivíduos examinados pelo método de digestão artificial em HCL a 0,7%. Segundo esses autores esses dados reforçam a importância do conhecimento sobre a helmintofauna associados a este molusco.

Neste estudo o gênero mais freqüente encontrado em *A. fulica* foi *Rhabditis* sp. O gênero *Rhabditis* constitui-se de nematóides de vida livre que vivem em matéria orgânica em decomposição, terra úmida e água salgada (BOWMAN, 2006), motivo pelo qual alcançam com muita facilidade os animais. No entanto, sugere-se que a ocorrência de *Rhabditis* sp. no Brasil esteja relacionada com a otite parasitária bovina, que ocorre em forma de surtos, e podem acometer até 100% dos animais de um mesmo rebanho (DUARTE et al., 2001). O primeiro relato de *Rhabditis* sp. em *A. fulica* no Brasil foi feito no Estado de Goiás por Oliveira et al. (2010), mas também há registro desse nematódeo em *A. fulica* provenientes de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro (ZANOL et al., 2010).

Larvas de *Strongyluris* sp. e *A. abstrusus*, ambas de interesse veterinário, também foram detectadas em *A. fulica* coletados em Feira de Santana. O nematódeo *Strongyluris* sp. é encontrado parasitando o intestino grosso de lacertídeos (ALHO, 1969), havendo referência deste parasito em *A. fulica* em Goiás (OLIVEIRA et al., 2010). Em um estudo

realizado por Thiengo et al. (2008) em vários estados brasileiros, 1,13% dos 3.806 espécimes de *A. fulica* examinados albergavam larvas de *Strongyluris* sp.

O presente estudo registrou o metastrongilídeo *A. abstrusus*, parasito de gatos domésticos, em *Achatina fulica* coletadas nas áreas urbanas de Feira de Santana. *Aelurostrongylus abstrusus* é o nematóide mais frequente encontrado em amostras de *A. fulica* examinadas no Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica - LRNM, IOC, FIOCRUZ (THIENGO et al., 2008). Larvas desse nematódeo também foram encontradas em *A. fulica* provenientes das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Norte (ZANOL et al., 2010; ANDRADE-PORTO et al., 2012; BRITO, 2012), com exceção da região Sul. Esses achados reforçam a importância do molusco *A. fulica* como hospedeiros intermediários de parasitos de animais domésticos. *Aelurostrongylus abstrusus* está sendo relatado pela primeira vez no estado da Bahia, ampliando a distribuição deste parasito no Brasil.

Os metastrongilídeos parasitos do ser humano, bem como de cães e outros mamíferos (ZANOL et al., 2010), têm importância por incluir *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* e *A. vasorum*. Estas espécies são de interesse médico e veterinário, e tem grande impacto na saúde pública e animal, entretanto a reação em cadeia pela polimerase não resultou em amplificação destes parasitos nas larvas estudadas. Estudos recentes confirmaram o encontro de larvas de *A. cantonensis* infectando naturalmente o molusco *A. fulica* nas regiões sul e sudeste do Brasil desde 2007 (THIENGO et al., 2013), em Pernambuco (LIMA et al., 2009; THIENGO et al., 2010), e mais recentemente no Pará no município de Belém (MOREIRA et al., 2012) e na Bahia no município de Ilhéus (CARVALHO et al., 2012). Não há registros na literatura de *A. fulica* infectados naturalmente por *A. costaricensis* e *A. vasorum* nos países.

A superfamília Metastrongyloidea é caracterizada por nematóides de tamanho moderado, constituindo de cerca de 180 espécies classificados em 46 gêneros e sete famílias (Metastrongylidae, Protostrongylidae, Crenosomatidae, Angiostrongylidae, Filaroididae, Skrjabinngylidae e Pseudaliidae). A maioria dos Metastrongylidae utilizam os gastrópodes terrestres como hospedeiro intermediário para se desenvolver até o terceiro estágio

infectante, a exceção dos nematóides que parasitam suídeos, que tem a minhoca como hospedeiro intermediário (ANDERSON, 2000). Assim, é provável que os metastrongídeos encontrados nesse estudo pertençam a outros gêneros que não *Angyostrongylus* spp.

Encontramos uma frequência maior de animais infectados nos locais 5 e 7, bem como naqueles coletados em praças e terrenos, e quando animais estavam presentes (Tabela 6). Nesses locais visualizamos a presença de gatos e cachorros, que podem atuar como hospedeiros definitivos de alguns parasitos. Além disso, nesses locais havia uma grande quantidade de lixo e vegetação abundante. Segundo Fischer e Colley (2004), a ocorrência e a proliferação do molusco *Achatina fulica* e de hospedeiros intermediários e definitivos ocorre em ambientes onde estão presentes restos de construção, lixo e plantas ornamentais. Essas condições podem ter favorecido o encontro de caramujos infectados nesses locais de coleta.

As variáveis climáticas, quando consideradas a média do mês de coleta, não foram significativamente correlacionadas à frequência relativa de resultados positivos para a presença de larvas de nematóides (Tabela 7). *Achatina fulica* é altamente dependente da temperatura, umidade e precipitação pluviométrica (RAUT, BARKER, 2002), o que torna esses animais mais ativos nesses períodos, o que provavelmente colocaria esses animais mais expostos aos parasitos e ao risco de infecção, entretanto neste estudo não foi demonstrada esta relação.

Tabela 6. Frequência absoluta (N) e relativa (%) de positivos e negativos para a presença de Nematoda em 220 espécimes de *Achatina fulica* submetidos ao método de digestão em solução de ácido clorídrico 0,7%, segundo as variáveis epidemiológicas e resultado da estatística. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.

Variável	Digestão em solução de HCl 0,7%				Estatísticas		
	Positivos		Negativos		χ^2	Valor de P	OR (IC95%)
	N	%	N	%			
Local de coleta							
1 a 4	0	0,0	21	100,0			nd
5	8	21,6	29	78,4			2,6 (0,7-9,6)
6	4	9,5	38	90,5	9,78	0,0442	1
7	9	18,4	40	81,6			2,1 (0,6-7,5)
8	7	9,9	64	90,1			1,0 (0,3-3,8)
Ponto de coleta							
Calçada	0	0,0	5	100,0			nd
Quintal	0	0,0	32	100,0	10,40 ^G	0,0154	nd
Praça	9	18,4	40	81,6			1,4 (0,6-3,2)
Terreno	19	14,2	115	85,8			
Presença de lixo							
Sim	24	14,2	145	85,8	0,91	0,3399	0,5 (0,2-1,6)
Não	4	7,8	47	92,2			
Presença de animais							
Sim	27	15,2	151	84,8	3,92	0,0478	7,3 (0,9-55,6)
Não	1	2,4	41	97,6			
Presença de esgoto							
Sim	10	14,1	61	85,9	0,04	0,8410	1,2 (0,5-2,7)
Não	18	12,1	131	87,9			
Idade							
Juvenil	0	0,0	20	100,0	-	0,0843	nd
Jovem	28	14,0	172	86,0			

Tabela 7. Correlações entre variáveis climáticas e a porcentagem de positivos em cada coleta. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.

Variáveis climáticas	Porcentagem de positivos por coleta	
	R	Valor de P
Temperatura	0,2764	> 0,0500
Umidade	0,1100	> 0,0500
Precipitação	0,1346	> 0,0500

A análise da massa corporal e comprimento total da concha de *A. fulica* e o resultado do método de digestão em HCl (0,7%) revelaram que houve diferença significativa das variáveis morfométricas com a presença de nematóides (Tabela 8), mostrando que animais maiores tiveram uma maior frequência de parasitos. Os caramujos maiores são mais errantes, e provavelmente tem maior exposição aos parasitos, assim como tiveram mais tempo para aumentar o grau de infecção. Franco-Acuña (2008) evidenciou uma forte correlação entre o tamanho do molusco *A. fulica* e o número de cistos, mostrando que caramujos com comprimento de concha de 56 mm e 106 mm estavam mais parasitados. O encontro de *Metastrongylidae* esteve associado com o comprimento total da concha do gastrópode, sendo os parasitos encontrados em *A. fulica* com mediana de 64 mm, contra mediana de 56 mm para *A. fulica* negativos. A presença de *A. abstrusus* e *Strongyluris* sp. não condicionou diferença para as variáveis morfométricas.

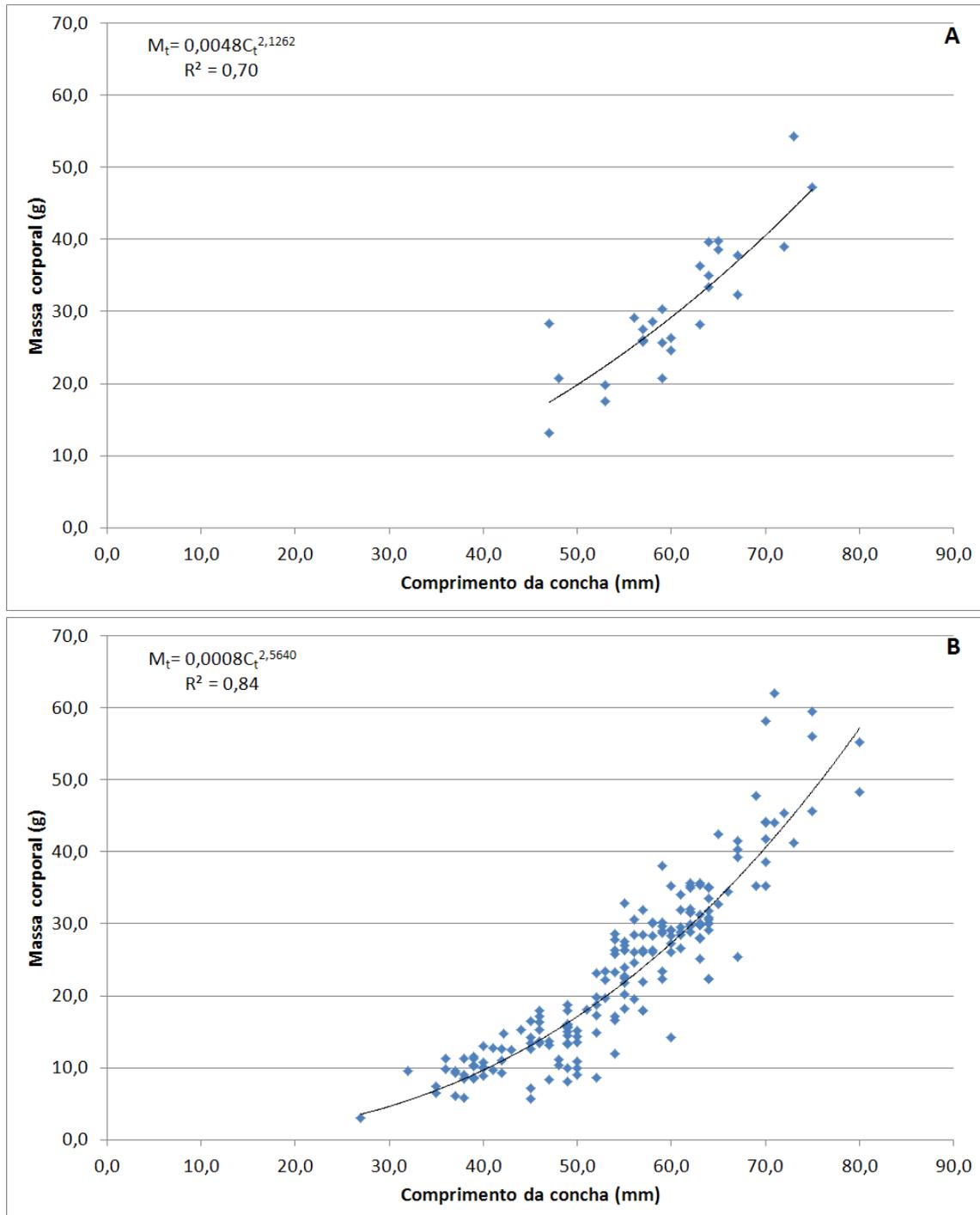
Tabela 8. Estatísticas descritivas de massa corporal e comprimento total da concha de 220 espécimes de *Achatina fulica* coletados, segundo o resultado do método de digestão em solução de ácido clorídrico 0,7%. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.

	Digestão em solução de HCl 0,7%							
	Positivos				Negativos			
	Média ± desvio-padrão	P25	Mediana	P75	Média ± desvio-padrão	P25	Mediana	P75
Massa corporal (g)	30,4 ± 9,0	25,7	28,4 ^b	37,0	23,4 ± 11,8	13,4	23,2 ^a	30,1
Comprimento total da concha (cm)	6,0 ± 0,7	5,7	5,9 ^b	6,4	5,4 ± 1,0	4,8	5,5 ^a	6,2

A figura 8 apresenta a relação alométrica entre massa corporal e comprimento da concha, em animais positivos e negativos para a presença de nematóides. Em *A. fulica* positivos, o valor de $b=2,1662$ ($r^2=0,70$), com equação alométrica $M_t=0,0048C_t^{2,1662}$, enquanto que em animais negativos $b=2,5640$ ($r^2=0,84$) e $M_t=0,0008C_t^{2,5640}$. A partir das equações obtidas para cada população de indivíduos negativos e positivos foram determinados coeficientes de alometria(b) <3 , indicando um crescimento alométrico negativo, ou seja, o crescimento é maior em comprimento do que em peso, tanto em caramujos negativos quanto os positivos para a presença de nematóides. Quando $b > 3$ o crescimento é alométrico positivo, onde o crescimento em peso é maior do que em comprimento e $b=3$, o crescimento é isométrico, ocorrendo de forma simétrica entre o peso e o comprimento (ARAÚJO et al., 2011).

Os animais não parasitados apresentaram um valor maior e mais próximo de 3, mostrando que estariam em melhores condições orgânicas, quando comparado a valor de b dos animais parasitados. O valor 3 teoricamente representaria o crescimento isométrico em situações fisiologicamente adequadas (ARAÚJO et al.,2011). As variações em torno desse parâmetro podem estar relacionadas à falta de alimento, efeito da predação ou até mesmo parasitismo. Portanto, o valor de b pode ser um indicativo do bem-estar da população.

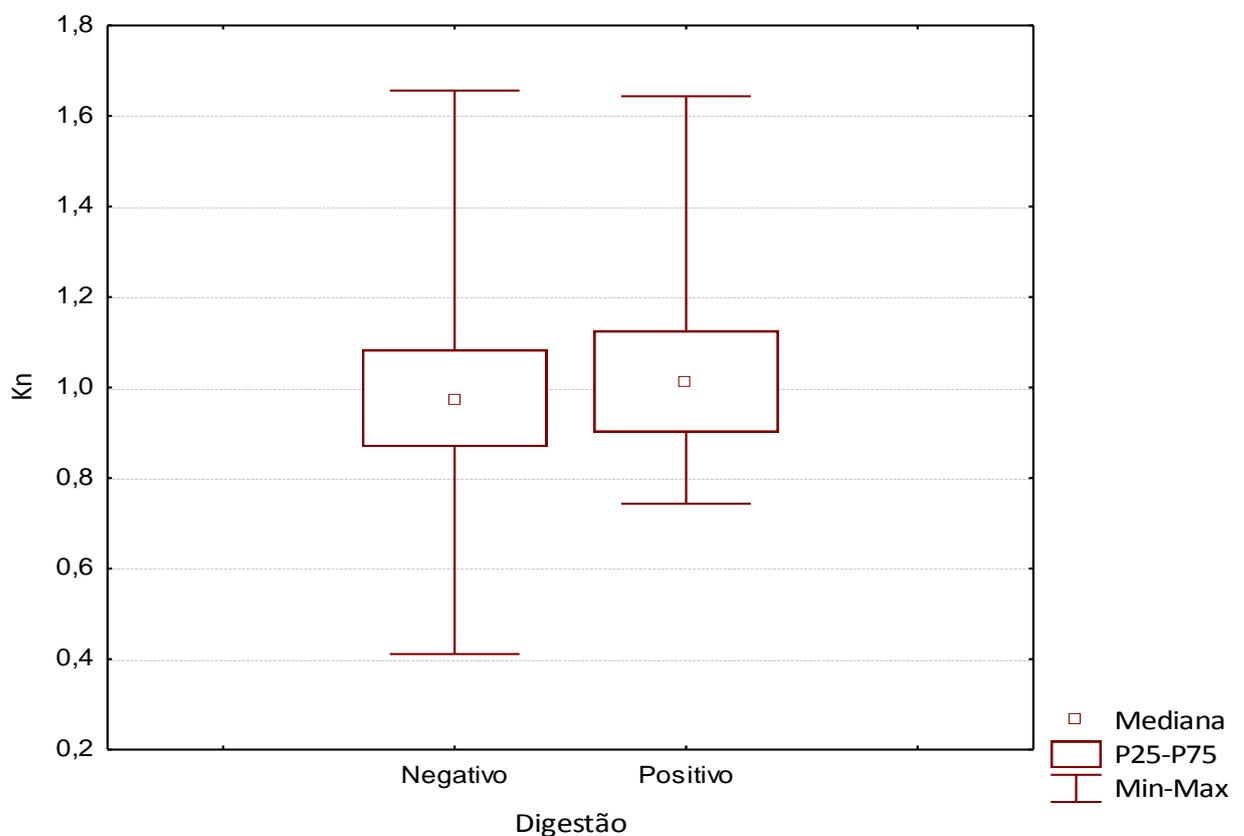
Figura 8. Relação alométrica entre a massa corporal (em gramas) de *Achatina fulica* pelo comprimento total da concha (em mm), para animais positivos (A) ou negativos (B) para a presença de larvas de nematóides. Feira de Santana, 2013.



Para os caramujos, o fator de condição reflete o bem-estar e a resposta às mudanças fisiológicas, principalmente durante o período de estivação e de baixa umidade

(VINCI et al, 1998; ALBERTONI et al, 2003). Além disso, o fator de condição é um elemento de estudos das relações entre o estado de saúde e o parasitismo (BRASIL-SATO,1999). No nosso estudo o fator de condição relativo (Kn) não diferiu significativamente entre os caramujos parasitados e não-parasitados (Figura 9). Desta forma não foi possível estabelecer uma relação entre o parasitismo e alterações fisiológicas das *A. fulica* estudadas.

Figura 9. Valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valores máximos do fator de condição relativo (Kn) de 220 espécimes de *Achatina fulica* coletados segundo o resultado do exame de digestão para a presença de larvas de nematóides. Feira de Santana, BA, Brasil. 2012-2013.



Dada a sua atual dispersão, o caramujo gigante africano tornou-se um problema de saúde pública e animal, pois estes podem transmitir nematóides de interesse médico e veterinário. Nossos resultados reforçam que *A. fulica* participa de ciclos biológicos de vários parasitos, que podem incluir animais domésticos e silvestres e, que o local de coleta e o tamanho do caramujo influenciaram no encontro de larvas de nematóides nos mesmos, mostrando que os ambientes urbanos são extremamente importantes na cadeia epidemiológica desses parasitos.

Conclusões

1. Foram encontrados quatro morfotipos de larvas de nematóides no molusco *A. fulica* provenientes do município de Feira de Santana (BA);
2. Não foram encontrados parasitos do gênero *Angiostrongylus* nos animais examinados;
3. Não houve associação entre as variáveis climáticas e a presença de larvas de nematóides nos indivíduos pesquisados;
4. O local de coleta e o tamanho do caramujo são variáveis que interferem diretamente no encontro de larvas de nematóides;
5. O coeficiente alométrico dos caramujos parasitados e não-parasitados apresentou um crescimento alométrico negativo e o fator de condição relativo (kn) não diferiu entre os mesmos.

Agradecimentos

À Dra. Silvana Thiengo do Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica (LRNMM- FIOCRUZ-RJ) pelo treinamento para identificação de nematódeos de interesse médico-veterinário, e ao Dr. Carlos Graeff-Teixeira e à Alessandra Morassuttido Laboratório de Parasitologia Molecular e Biologia Parasitária da PUC-RS, pela cepa AKita de *Angiostrongylus cantonensis*. Os autores agradecem ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM-UEFS) pelo suporte físico, e a CAPES, FAPESB e CNPq pela concessão de bolsas de estudo e suporte financeiro durante a pesquisa. Ainda agradecemos aos funcionários e estagiários do laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia da UEFS e aos membros do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública pelo apoio durante a realização da fase experimental.

Referências

- ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F.A. Overlap of dietary niche and electivity of three shrimp species (Crustacea: Decapoda) in a tropical coastal lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 1, p. 135-140, 2003.
- ALBUQUERQUE, F.S.; PESO-AGUIAR, M.C.; ASSUNÇÃO-ALBUQUERQUE, M.J.T.; GÁLVEZ, L. Do climate variables and human density affect *Achatina fulica* (Bowdich) (Gastropoda: Pulmonata) shell length, total weight and condition factor? **Brazilian Journal of Biology**, v. 3, n. 69, p. 879-885, 2009.
- ANDERSON, R.C. **Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission**. 2 ed. Canadá, 2000. p. 241.
- ANDRADE-PORTO, S.M.; SOUZA, K. C. P.; CÁRDENAS, M.Q.; ROQUE, R.A.; PIMPÃO, D.M., ARAÚJO, C.S.; MALTA, J.C.O. Occurrence of *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) larvae (Nematoda: Metastrongylidae) infecting *Achatina (lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) in Amazon region. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 2, p. 245-250, 2010.
- ARAÚJO, C.C.; FLYNN, M.N.; PEREIRA, W.R.L. Fator de condição e relação peso-comprimento de *mugilcurema valenciennes*, 1936 (pisces, mugilidae) como indicadores de estresse ambiental. **Revista Intertox de toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n. 3, p.51-64, 2011.
- ASH, R.L. Diagnostic morphology of the third stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Angiostrongylus abstrusus* and *Anafilarioides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). **Journal of Parasitology**, v. 56, n. 2, p.249-253, 1970.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007. 364p.
- BERTO, B.; BOGÉA, T. Occurrence of Nematode larvae in *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Gastropoda: Achatinidae) snails in Vargem Pequena, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, p. 171-177, 2007.
- BOWMAN, D.D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8 ed. Barueri, SP: Manole, 2006.442p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/> Acesso em: 18 de janeiro de 2013.
- BRASIL-SATO, M.C. **Ecologia das comunidades de parasitos metazoários de *Pimelodus maculatus* La cèpède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) das bacias do rio São Francisco, Três Marias, MG e do rio Paraná, Porto Rico, PR**. Tese, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

BRITO E.F. **Larvas de *Aelurostrongylus* ssp. em *Achatina fulica* no Estado de Tocantins, Brasil e seu impacto na produção animal.** 2012. 51f. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal tropical), Universidade Federal do Tocantins, 2012.

CALDEIRA, R.L.; CARVALHO, O.S.; MENDONÇA, C.L.F. G.; GRAEFF-TEXEIRA, C.SILVA, M.C. F.; BEM, R.; MAURER, R.; LIMA, W.S.; LENZI, H.L. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment length Polymorphism. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1039-1043, 2003.

CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.; GOVEIA, C.O.; LENZI, H.L.; GRAEFF-TEXEIRA, C.; LIMA, W.S.; MOTA, E.M.; PECORA, I.L.; MEDEIROS, A.M.Z.; CARVALHO, O.S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematode: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007.

CARVALHO, O.S.; SCHOLTE, R.G.C.; MENDONÇA, C.L.F.; PASSOS, L.K.J.; CALDEIRA, R.L. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbor areas in Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 740-746, 2012.

DEAN, A. G.; ARNER, T. G.; SUNKI, G.G.; FRIEDMAN, R.; LANTINGA, M.; SANGAM, S.; ZUBIETA J. C.; SULLIVAN, K. M.; BRENDEL, K.A.; GAO, Z.; FONTAINE, N.; SHU, M.; FULLER, G.; SMITH, D.C.; NITSCHKE, D.A.; FAGAN, R.F. **Epi info™, a Data Base and Statistics Program for Public Health Professionals.** CDC, Atlanta, GA, USA, 2011.

DUARTE, E. R.; MELO, M. M.; HAMDAN, J.S. Epidemiological aspects of bovine parasitic otitis caused by *Rhabditis* spp. and/or *Raillietia* spp. in the state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 45-52, 2001.

FISCHER, M.L.; AMADIGI, I.S.N. História natural da *Achatina fulica*. In: FISCHER, M.L.; COSTA, L.C.M. (Org (s)). **Caramujo Gigante *Achatina fulica* no Brasil.** Curitiba: Ed. Champagnat, 2010. P. 49-99.

FISCHER, M.L.; COLLEY, E. Diagnóstico da ocorrência do caramujo gigante africano *Achatina fulica* Bowdich, 1822 na APA de Guaraqueçaba. **Estudos de Biologia**, Curitiba, v.26, n. 54, p. 43-50, 2004.

FISCHER, M.L.; COLLEY, E.; AMADIGI, I.S.N.; SIMIÃO, M.S. Ecologia de *Achatina fulica*. In: FISCHER, M.L.; COSTA, L.C.M. (Org (s)). **Caramujo Gigante *Achatina fulica* no Brasil.** Curitiba: Ed. Champagnat, 2010. p. 102-140.

FRANCO-ACUÑA, D.O. **Morfologia e ultraestrutura de larvas de nematoides encontrados em *A. fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) e sua relação com atividade antrópica no município de Mesquita, Rio de Janeiro, Brasil.** 2008. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

GUIDELLI, G.; TAVECHIO, W.L.G.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. Relative condition factor and parasitism in anostomid fishes from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 2, p. 145-151, 2011.

LIZAMA, M.A.P. **Estudo da relação entre a comunidade parasitária, meio ambiente e dinâmica da população de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) e *Astyanaxaltiparanae* Garutti & Bristki, 2000, na planície de inundação do Alto rio Paraná, Brasil.** 2003, 112f. Tese, (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais), Universidade Estadual de Maringá Brasil, 2003.

MALDONADO-JÚNIOR, A.; SIMÕES, R.O.; OLIVEIRA, A.P.M.; MOTTA, E.M.; FERNANDEZ, M.A.; PEREIRA, Z.M.; MONTEIRO, S.S.; TORRES, E.J.L.; THIENGO, S.C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 105, n. 7, p. 938-941, 2010.

MORAES, R.G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estromgiloidose no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 1, n.1, p. 507-624, 1948.

OHLWEILER, F.P.; GUIMARÃES, M.C.A.; TAKAHASHI, F.Y.; EDUARDO, J.M. Current distribution of *Achatina fulica*, in the state of São Paulo including records of *Aerulostrongylus abstrusus* (Nematoda) larvae infestation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 4, p. 211-214, 2010.

OLIVEIRA, A.P. M.; TORRES, E.J.L.; MALDONADO JÚNIOR, A.; ARAÚJO, J.L.B.; FERNANDEZ, M.A.; THIENGO, S.C. *Achatina fulica* como hospedeiro intermediário de nematódeos de interesse médico-veterinário em Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 3, p. 199-210, 2010.

PEREIRA, Z.M. **Estudo das percepções de estudantes da rede pública e da fauna de helmintos associada com o caramujo *Achatina fulica* Bowdich Africano, 1822 (Mollusca, Gastropoda) em Barra do Pirai (RJ): suporte para uma intervenção educativa.** 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Saúde), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

RAUT, S. K.; BARKER, G.M. *Achatina fulica* Bowdich and others Achatinidae pest in tropical agriculture. In: BARKER, G. (Org). **Mollusks as croup pest.** New Zealand: CAB Publishing, 2002. p. 55-114.

SIMIÃO, M.S.; FISCHER, M.L. Estimativa e inferências do método de controle do molusco exótico *Achatina fulica* no Pontal do Paraná, Litoral do Estado do Paraná. **Caderno da biodiversidade**, v. 4, n. 2, p. 74-84, 2004.

SLOSS, M.W.; ZAJAC, A.M.; KEMP, R.L. **Parasitologia Clínica Veterinária.** São Paulo: Manole. 1999. 198p.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; KRONKA, S.N. Condition factor, hepatosomatic and splenosomatic relation of freshwater fishes naturally parasitized. **Acta Scientiarum**, v.22, n.2, p. 533–537, 2000.

TELES H. M. S.; FONTES, L. R. Implicações da introdução e dispersão de *Achatina fulica* Bowdich, 1922 no Brasil. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v. 12, n. 1, p. 3-25, 2002.

THIENGO, S.C.; FARACO, F.A.; SALGADO, N.C.; COWLE, R.H.; FERNANDEZ, M.A. Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brazil. **Biological Invasions**, v. 9, n. 6, p. 693-702, 2007.

THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.A.; TORRES, E.J. L.; COELHO, P.M.; LANFREDI, R.M. First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aerulostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina (Lissaachatina) fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 1, p. 34-39, 2008.

THIENGO, S.C.; SIMÕES, O.R.; FERNANDEZ, M.A.; MALDONADO-JÚNIOR, A. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. **Journal of medicine & public health**, v. 72, n. 6, p. 18-22, 2013.

TOMIYAMA, K. Age dependency of sexual role and reproductive ecology in a simultaneously hermaphroditic land snail, *Achatina fulica* (Stylommatophora: Achatinidae). **Venus**, Tokyo, v. 60, n. 4, p. 273-283, 2002.

VINCINI, G.K.; UNNITHAN, V.K.; SUGUNAN, V.V. Farming of the giant african snail, *Achatina fulica*. **Central Island Capture Fisheries Research Institute**, v. 56, n.8, p.1-24, 1998.

WALLACE, G.D.; ROSEN, L. Studies on eosinophilic meningites. V. molluscan hosts of *Angiostrongylus cantonensis* on the Pacific Islands. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.18, n.2, p.206-216, 1969.

ZANOL, J.; FERNANDEZ, M. A.; OLIVEIRA, A.P. M.; RUSSO, C. A. M.; THIENGO, S. C. O caramujo exótico invasor *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) no Estado do Rio de Janeiro (Brasil): situação atual. **Revista Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 447-451, 2010.

PESQUISA DE APICOMPLEXA EM *Achatina fulica* BOWDICH (1822)

Patrícia Hercília Arcanjo de Almeida⁷, Sofia Aline Amaral Santos⁸, Aristeu Vieira da Silva⁹

Resumo

Com o objetivo de pesquisar a presença de DNA de Apicomplexa em fezes de *Achatina fulica*, foram coletados de maio de 2012 a junho de 2013 caramujos de oito áreas do município Feira de Santana - BA. Os animais foram coletados no início da manhã e transportados para o laboratório do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública- UEFS. Durante o período de coleta também foram feitas observações sobre os locais de coleta. As variáveis climáticas foram disponibilizadas pelo Instituto Nacional de Meteorologia. No laboratório os animais foram lavados em água corrente e mensurados. Os caramujos foram colocados em frascos plásticos individuais e alimentados com água e repolho todos os dias até o processamento das amostras de fezes. As folhas de repolho foram submetidas a exames parasitológicos para detectar a presença de protozoários e helmintos. As amostras de fezes foram ressuspensas em igual volume de etanol PA e congeladas para posterior extração de DNA, utilizando kit comercial. As amplificações foram realizadas por meio de *n*PCR dirigido para fragmentos de DNA ribossomal de *Cryptosporidium* e Sarcocystidae em reações separadas. Para *Cryptosporidium* ssp., amplicons compatíveis foram encontrados em 2 (0,9%) de 223 amostras analisadas. Das 223 amostras submetidas à *n*PCR para detecção de Sarcocystidae, 58 (26,0%) amostras amplificaram o fragmento esperado de 290 pares de base, sendo então submetidas à RFLP. Destas, 41 (18,4%) amostras foram clivadas pelas enzimas utilizadas nesse estudo, produzindo um perfil compatível com *T. gondii*. As outras 17 amostras não foram compatíveis com outros Sarcocystidae. Considerando os resultados obtidos, o molusco *Achatina fulica* pode vir a ser considerado um indivíduo participante da

⁷ Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Zoologia (PPG-Zoo), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA; bolsista de Mestrado FAPESB.

⁸ Acadêmica do PPG-Zoo/UEFS, Feira de Santana, BA; bolsista de Mestrado CAPES.

⁹ Coordenador do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas (DBIO), UEFS, Feira de Santana, BA, bolsista de Produtividade em Pesquisa nível 2 CNPq.

cadeia epidemiológica destes parasitos. Este é o primeiro relato da presença de DNA compatível com *T. gondii* em *A. fulica*.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. *Toxoplasma gondii*. Fezes. Caramujo-gigante africano.

Abstract

In order to search for the presence of DNA of Apicomplexa in feces of *Achatina fulica*, snails of eight areas of the municipality Feira de Santana-BA were collected from may 2012-June 2013. The animals were collected early in the morning and transported to the laboratory of Zoonosis and Public Health Research Group - UEFS. During the collection period were also made appointments on the collection sites. Climatic variables were provided by the National Institute of Meteorology. In the laboratory, the animals were washed in running water and measured. The snails were placed in individual plastic bottles and fed with water and cabbage every day until the processing of stool samples. The leaves of cabbage were submitted to parasitologic test to detect the presence of protozoans and helminths. Stool samples were then be resuspended in an equal volume of ethanol PA and frozen for later extraction of DNA, using commercial kit. Nested PCR (nPCRs) to ribosomal DNA fragments of *Cryptosporidium* and Sarcocystidae were performed in separate reactions. For *Cryptosporidium* ssp., amplicons compatible were found in 2 (0.9) of 223 samples analysed. Of the 223 samples submitted to the nPCR for Sarcocystidae detection, 58 (26.0) samples amplified the 290 base pair fragment expected, being then subjected to RFLP. Of these, 41 (18.4) samples were cleaved by enzymes used in this study, producing a profile compatible with *T. gondii*. The other 17 samples were not compatible with other Sarcocystidae. Considering the results obtained, *Achatina fulica* might be considered a participant of epidemiological chain of these parasites. This is the first report of the presence of DNA compatible with *T. gondii* in *A. fulica*.

Key-words: *Cryptosporidium*. *Toxoplasma gondii*. Stool. African Giant Snail.

Introdução

Os protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Coccidea, são responsáveis por doenças em seres humanos e animais, sendo algumas delas importantes zoonoses. Os oocistos desses parasitos podem persistir por longos períodos no ambiente, mantendo sua infectividade mesmo sob condições ambientais adversas e são importantes para a dispersão e transmissão para os hospedeiros, pois podem contaminar a água, solo e vegetais (SINSKI, BEHNKE, 2004). Entre os coccídeos, destacam-se *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium*, responsáveis por causar infecções em humanos, animais domésticos e silvestres.

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, ocorrendo em diversas espécies homeotérmicas, incluindo o homem. Este parasito é responsável pela toxoplasmose, que é geralmente assintomática em pessoas imunocompetentes. É capaz de determinar uma forma grave e geralmente fatal nos casos de transmissão congênita, causando problemas neurológicos e oftalmológicos nos recém-nascidos e em pacientes com imunodepressão causando a encefalite. (DUBEY, 2002; TENTER et al., 2000). Os felídeos atuam como hospedeiros definitivos e, portanto, os únicos que podem contaminar o ambiente com oocistos (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2004). A transmissão dessa zoonose ocorre através da ingestão de carne crua contendo cisto tecidual, pela via transplacentária quando ocorre uma primoinfecção durante a gestação, ou pela ingestão de oocistos esporulados presentes na água, solo ou alimentos contaminados (DUMÉTRE, DARDÉ, 2003; FERGUNSON, 2009).

Cryptosporidium spp. é um protozoário parasito de uma grande variedade de vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis e peixes (DAWSON, 2005), de ciclo monoxeno (AMARANTE, 1992; O'DONOGHUE, 1995). Este parasito causa uma doença gastrointestinal aguda auto-limitada em indivíduos imunocompetentes, mas em pessoas imunocomprometidas pode contribuir para morbidade e mortalidade (DAWSON, 2005). Sua transmissão é através da rota fecal-oral ou por ingestão de oocistos esporulados presentes na água, no solo ou alimentos contaminados (FAYER et al., 2000).

Os oocistos esporulados destes coccídeos são extremamente resistentes às influências ambientais. Oocistos de *T. gondii* no solo tornam-se infectantes por esporulação em até 21 dias (TENTER, 2000) e podem permanecer viáveis por até 18 meses (FRENKEL et al., 1975). Os oocistos de *Cryptosporidium* permanecem viáveis por aproximadamente 18 meses em solo úmido e fresco (CAREY, 2004; FALCHI, 2006). Ambos são resistentes a diversos agentes químicos e físicos. No meio ambiente esses oocistos são distribuídos através do vento, água, por invertebrados terrestres e pelo próprio homem que usam fezes de animais ou própria para adubo, contaminando as águas, solo e vegetais (DUMÉTRE, DARDÉ, 2003; GRECA, 2010). Assim, a presença de oocistos esporulados no ambiente pode ser uma fonte de infecção para os seres humanos, animais domésticos e silvestres.

O molusco *Achatina fulica*, conhecido como caramujo gigante africano, tornou-se um problema de saúde pública, pois pode albergar e transmitir os nematódeos *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*, causadores da meningoencefalite eosinofílica e da angiostrongilíase abdominal, respectivamente (GRAEFF-TEXEIRA, 2007). Esses animais têm destaque em saúde pública por serem responsáveis pela transmissão de uma variedade de enfermidades (SCHIFFLER et al., 2008). O fato da espécie *A. fulica* viver em contato direto com o solo e preferencialmente em locais úmidos e poluídos (VASCONCELOS, PILE, 2001) e possuir o hábito de se alimentar de solos úmidos e vegetais (FISCHER, AMADIGI, 2010) torna esses caramujos prováveis vetores mecânicos de parasitos que podem causar doenças em humanos e animais.

Desta forma, presença de *Achatina fulica* em áreas sem saneamento básico adequado e com a presença de animais contaminando o solo, pode ser fator predisponente para infecção dessa espécie pelos protozoários citados. Com isso o presente estudo teve como objetivo pesquisar a presença de DNA de Apicomplexa em fezes de moluscos *A. fulica*, no município de Feira de Santana, Bahia, verificando o possível papel desse gastrópode na cadeia epidemiológica de parasitoses causadas por estes organismos.

Matériaiais e Métodos

Entre maio de 2012 a junho de 2013 foram realizadas 27 coletas de *A. fulica* em oito áreas do perímetro urbano do município de Feira de Santana- Bahia (12°16'S e 38°58'O).

Os animais foram coletados no inicio da manhã, aproximadamente às cinco horas. A coleta dos moluscos foi feita manualmente com as mãos protegidas por luvas de borracha. Os caramujos encontrados foram acondicionados em caixas isotérmicas com tampa adaptada para permitir a aeração. Após cada coleta os espécimes foram transportados ao Laboratório do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública- UEFS.

Durante o período de coleta foram realizadas também observações dos locais onde os moluscos estavam presentes quanto à presença de lixo, presença de animais domésticos e presença de esgoto. Os dados climáticos (temperatura média, precipitação diária e umidade relativa) no dia das coletas foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (BRASIL, 2013).

No laboratório os animais foram lavados em água corrente e mensurados o comprimento total da concha com paquímetro (precisão de 0,1 mm), e a massa total da concha com a parte mole em balança digital (precisão de 0,01g). O estágio de desenvolvimento etário utilizado foi de acordo com a classificação de Tomiyama (2002) que considera juvenis os caramujos com conchas de 10 a 40 mm; jovens os indivíduos com conchas de 41 a 90 mm e adultos aqueles com conchas acima de 90 mm de comprimento. Os animais jovens e adultos foram separados e mantidos em frascos plásticos com tampa perfurada, até o processamento das amostras de fezes.

Os gastrópodes foram alimentados todos os dias com água e folhas de repolho (*Brassica oleracea* var. *carpitata*), até liberarem cerca de 2 g de fezes. As amostras de fezes foram ressuspendidas em igual volume de etanol PA e congeladas para posterior extração de DNA. O repolho foi previamente examinado para a presença de protozoários e helmintos segundo a técnica descrita por (SLOSS et al.1999). Nestas amostras não foram encontrados protozoários e helmintos parasitos.

A extração e purificação de DNA das amostras de fezes foram iniciadas em três etapas de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para concentrar e romper oocistos, seguidas pela utilização de kit de extração *AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit, AP-MN-MS-GDNA-50 (Axygen®)*, conforme instrução do fabricante com algumas alterações (Apêndice B).

Para a detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp. foram utilizados oligonucleotídeos dirigidos para um fragmento do gene 18S rRNA (SILVA et al., 2013) pela *nested-PCR*. Na primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos externos SHP1 (5' ACC TAT CAG CTT TAG AGG GTA GGG TAT 3') e SHP2 (5' TTC TCA TAA GGT GCT GAA GTA AGG 3'), e para a segunda reação, os oligonucleotídeos internos SHP3 (5' ACA GGG AGG TAG TGA CAA GAA ATA ACA 3') e SSU-R3 (5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3'). Para a PCR as reações foram realizadas em volume de 25,0 µL com 12,5 µL *Top Taq Master Mix (Qiagen®)*, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 5,0 µL de amostra e 5,5 µL de água ultra-pura estéril. As amplificações foram realizadas em um termociclador *Master cycler epgradient Eppendorf* nas seguintes condições: denaturação inicial a 94°C por três minutos, seguidos de 39 ciclos de 94°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos, com extensão final a 72°C por sete minutos. Na segunda amplificação foram utilizadas as mesmas condições. Em cada lote de amplificação foi adicionado um controle positivo constituído por DNA extraído de *Cryptosporidium canis* provenientes de fezes de cães cedidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e dois controles negativos de amplificação constituídos por água ultra-pura, para cada uma das reações de PCR.

Para detecção de DNA de Sarcocystidae foram utilizados oligonucleotídeos dirigidos para um fragmento do gene 18S rRNA (DA SILVA et al., 2009) pela *nested-PCR*. Os oligonucleotídeos externos foram Tg18s48F (5'-CCATGCATGTCTAAGTATAAGC-3') e Tg18s359R (5'-GTTACCCGTCCTGCCCAC-3') e os oligonucleotídeos internos Tg18s58F (5'-CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC-3') e Tg18s348R (5'-TGCCACGGTAGTCCAATAC-3'). Para as reações de amplificação a concentração dos reagentes utilizados foi como descrito acima. As

amplificações foram realizadas em termociclador *Master cycler epgradient Eppendorf* nas seguintes condições: denaturação inicial de 95°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos. Na segunda reação foram utilizadas as mesmas concentrações de reagentes, substituindo-se os oligonucleotídeos pelo par apropriado e usando 5,0 µL do produto da primeira amplificação. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: denaturação inicial de 95°C por 4 minutos, seguindo de 35 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos. A cada lote de amplificações foi incluído um controle positivo (DNA extraído de *T. gondii*) e dois controles negativos (água ultrapura).

Alíquotas de 5,0 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5,0 µL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 2 % com brometo de etídio em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x. A corrida foi realizada a 120 voltz por 45 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado e fotografado em sistema digital *L-Pix image* (versão 1.21) *Loccus* Biotecnologia.

A análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição sobre os produtos amplificados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR-RFLP) foi realizada utilizando as enzimas de restrição DdeI, Hpy188III e MspI sobre os produtos de amplificação com 290 pares de base de DNA de Sarcocytidae, a fim de se diferenciar *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* (Da Silva et al, 2009). As digestões foram realizadas num volume total de 6,0 µl, contendo 3,0 µl do produto da *nested*-PCR misturados a 1,0 µl de tampão NEB, 1,0 µl de albumina sérica bovina (BSA) 1mg/ml, 0,4 µl de água ultra pura, 4U de DdeI, 1U de Hpy188III e 8U de MspI. As amostras foram incubadas sob as seguintes condições: digestão 37°C por 60 minutos e inativação das enzimas a 65°C durante 10 minutos. Em cada lote de clivagem enzimática foram adicionados controles positivos constituídos por DNA extraído de *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* cedidos pelo Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais da Universidade Federal da Bahia.

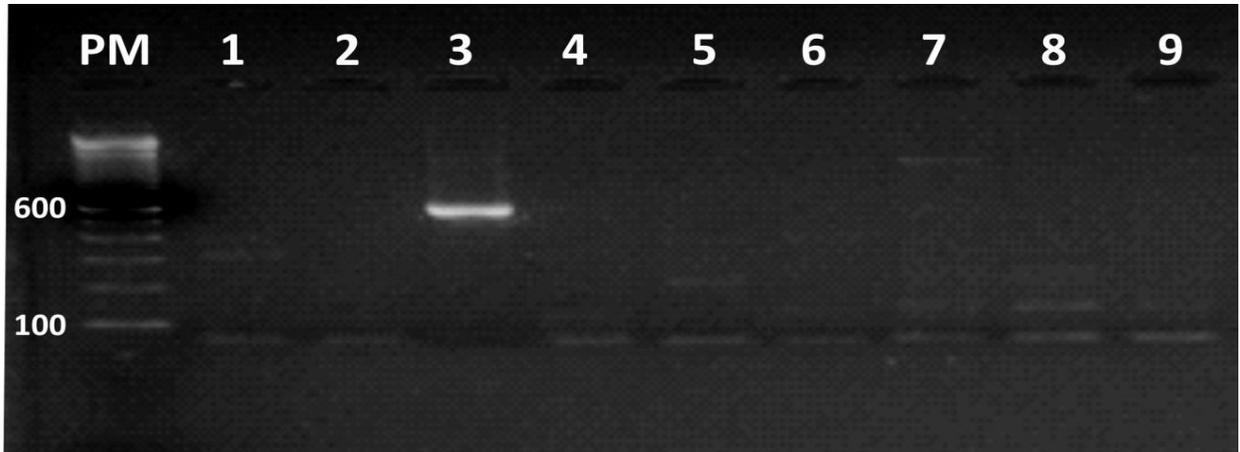
Do produto resultante da digestão enzimática, 5,0 µl foram homogeneizados com 5,0 µl de solução de azul de bromofenol e submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose a 3%, contendo 0,3 µg de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão Tris–Borato-EDTA (TBE) 1 X, pH 8,0, durante 55 minutos a 120V. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado e fotografado em sistema de fotodocumentação digital, sistema *L-Pix image* (versão 1.21) *Loccus* Biotecnologia.

A associação entre variáveis dependentes e independentes foi verificada em tabelas de contingência pelos testes de χ^2 de Pearson, Exato de Fischer ou G de Williams, utilizando-se o programa EpiInfo 7 (DEAN et al., 2011). O comprimento total da concha, a massa corporal foi comparada entre animais positivos e negativos para a presença de DNA compatível com os parasitos pelo teste de Mann-Whitney. Em todas as análises foram considerados significativos os valores de P menores que 0,05 (AYRES et al., 2007).

Resultados e Discussão

Para *Cryptosporidium* ssp., amplicons compatíveis com este parasito foram encontrados pela nPCR em 2 de 223 (0,9%) amostras de fezes examinadas (Figura 10). Este resultado pode estar relacionado com a falta de saneamento básico onde estes animais foram encontrados. Como *Cryptosporidium* é um importante parasito oportunista de várias espécies de animais e de humanos, este fato pode ter colaborado para o encontro desse parasito em fezes do molusco *A. fulica*.

Figura 10. Produtos da nested-PCR com os oligonucleotídeos dirigidos para um fragmento do gene 18S rRNA contendo 600 pares de bases de *Cryptosporidium* ssp. de amostras fecais do molusco *Achatina fulica*. PM: Marcador de Peso Molecular de 100pb; 1-9: Amostras fecais de *Achatina fulica*; 3: Amostra positiva de *Cryptosporidium* ssp.



Schiffler et al. (2008) analisaram 50 amostras de fezes de *Achatina fulica* na cidade de Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro, através da técnica de Ziehl-Neelsen modificada, detectando 26 (56%) amostras com oocistos de *Cryptosporidium* ssp., sendo este o único estudo encontrado na literatura brasileira que relata a presença de *Cryptosporidium* spp. nas fezes de *A. fulica*. Segundo esses autores os oocistos encontrados são de tamanhos compatíveis com espécies encontradas em cão, gato e no homem.

Em um estudo feito no Chile na Região de Valparaíso por Otero et al. (2010), em duas espécies de gastrópodes terrestres (*Helix áspera* e *Deroceras reticulatum*), foi observado através da técnica Ziehl-Neelsen, nPCR e sequenciamento, a presença de *Cryptosporidium parvum* em ambas espécies estudadas. Observou-se também que o perfil era semelhante ao genótipo C do parasito, que estão envolvidos na transmissão zoonótica da criptosporidiose. Para estes autores esses gastrópodes terrestres podem atuar como vetores mecânicos de *C. parvum* e servir como bioindicadores de contaminação fecal do solo.

Esse achado é importante, pois esses caramujos podem defecar em vegetais ou em outros alimentos que são consumidos mal higienizados podendo ser uma fonte de infecção

para os humanos. Oocistos de *Cryptosporidium* já foram encontrados em diferentes vegetais (FAYER et al., 2000; PEREIRA et al., 2008).

Outro fator relevante para infecção de *Cryptosporidium* ssp. em *Achatina fulica* está relacionada com o contato direto e pela ingestão de solo contaminado com fezes de humanos e animais com oocistos desse parasito. A contaminação ambiental por oocistos de *Cryptosporidium* sp. depende de uma variedade de fatores incluindo, o número de animais domésticos e silvestres infectados, o número de oocistos excretados, as práticas agrícolas e a conduta e atividade do hospedeiro (SLIFKO, 2000). No Brasil não existem estudos a respeito da contaminação ambiental do solo por oocistos de *Cryptosporidium*. No entanto, em um estudo realizado na Espanha por Dado et al.(2012) em 67 parques públicos da cidade de Madrid, 27 parques (40,3%) estavam contaminados com *Cryptosporidium* sp. (6%), demonstrando que os parques públicos representam uma fonte de infecção para este parasito.

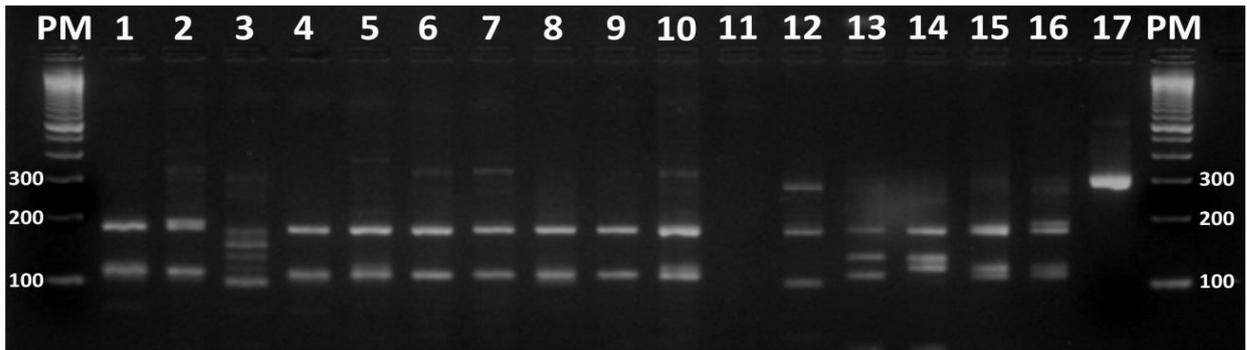
Segundo Otero et al. (2010), em relação à saúde animal, gastrópodes terrestres podem constituir uma fonte de infecção por *Cryptosporidium* para várias espécies predadoras de moluscos, pois estes são uma fonte alimentar para animais vertebrados e invertebrados.

Com a presença de DNA compatível com *Cryptosporidium* encontrados nesse estudo, podemos inferir que *A. fulica* seja um hospedeiro paratênico de espécies desse parasito, porém a confirmação dessa hipótese deverá ser realizada utilizando o sequenciamento e a genotipagem para a confirmação das espécies envolvidas.

Das 223 amostras de fezes de *Achatina fulica* submetidas à nPCR para detecção de Sarcocystidae, 58 (26,0%) amostras amplificaram o fragmento esperado de 290 pares de base, sendo então submetidas à RFLP. Destas, 41 (18,4%) amostras foram clivadas pelas enzimas utilizadas nesse estudo, produzindo um perfil compatível com *T. gondii* (Figura 11). As outras 17 amostras revelaram perfis de clivagem não compatíveis com os Sarcocystidae descritos no trabalho de Da Silva et al (2009).

Figura 11. Diferenciação de parasitos Apicomplexa pela técnica de RFLP do fragmento gênico 18S rRNA. O produto de nested-PCR foi digerido com as enzimas de restrição Ddel, MspI e Hpy188III.

Legenda: PM: marcador de peso molecular de 100 pb; 1-12: amostras de fezes de *A. fulica*; 1, 2,4,5,6,7,8,9,10: amostras compatíveis com DNA de *T. gondii*; 13: produto de digestão de *H. hammondi*; 14: produto de digestão de *N. Caninum*; 15: produto de digestão de *T. gondii*;16: Produto de digestão de *S. neurona*; 17: produto não digerido de *T. gondii*.



Este estudo registra pela primeira vez a amplificação de material genético compatível com *T. gondii* em fezes de moluscos terrestres. Tal fato pode estar relacionado com a presença de *A. fulica* em áreas urbanas e periurbanas, associado ao estreito convívio com gatos domésticos e suas fezes. Os felídeos são a única fonte de eliminação de oocistos e responsáveis pela contaminação ambiental (DUBEY, 2004; TENTER, 2000).

No solo os oocistos esporulados de *T. gondii* sobrevivem por longos períodos em condições ambientais favoráveis de temperatura e umidade. Eles são encontrados na superfície do solo ou em uma profundidade de até 10 cm e permanecem viáveis por 18 meses sob várias temperaturas (FRENKEL et al., 1975). A carga real de oocistos de *T. gondii* no solo não é bem conhecida. Estudos realizados na Califórnia e na França conseguiram estimar a carga de oocistos através de estimativas de produção de oocistos pelos gatos, o número de oocistos de *T. gondii* variou entre 9-434 e 3-335 por metro quadrado respectivamente (DABRITZ et al., 2006; AFONSO et al., 2010).

No Brasil tem sido registrada a contaminação do solo por oocistos de *Toxoplasma*. Coutinho et al. (1982) verificaram cinco amostras de solo coletadas dos jardins e também de áreas com sombra úmida na proximidade de residências no Estado da Paraíba, demonstrando a presença de oocistos de *T. gondii* em uma amostra de solo obtida de um

jardim. Esses resultados reforçam ainda mais precauções essenciais para o controle da toxoplasmose. Azevedo et al (1983) também encontraram oocistos de *T. gondii* em 2 das 115 amostras de solo coletadas em um terreno peridomiciliar e de terreno baldio no município de Recife-PE. Em estudo realizado no estado de São Paulo foi encontrado oocistos de *T. gondii* em 10 das 31 amostras de solo coletadas de parques infantis de escolas do ensino fundamental (SANTOS et al., 2010). Os autores concluíram que os oocistos de *T. gondii* estão distribuídos em torno das escolas públicas da região, podendo ser uma fonte de infecção para as crianças.

O encontro de oocistos no solo é preocupante, pois invertebrados geo ou coprofágicos são potenciais vetores mecânicos de oocistos de *T. gondii* (FRENKEL, 1975). De acordo com Bettiol et al. (2000), os gatos domésticos tendem a enterrar suas fezes em camadas superficiais do solo, assim uma variedade de invertebrados terrestres incluindo besouros, isópodes, moluscos e larvas de dípteros podem ingerir oocistos infectantes de *T. gondii* pelo contanto direto com as fezes dos felinos. Estudos experimentais já demonstraram que minhocas e baratas (WALLACE, 1972; CHICHILLA et al., 1994; BETTIOL et al., 2000) podem atuar como vetores mecânicos de oocistos de *T. gondii*.

O solo tem um papel importante para o molusco *A. fulica*, pois além de ser utilizado como fonte de alimento, também é usado como estratégia de defesa (FISCHER et al., 2010). Assim, esses caramujos são susceptíveis a infecção por *T. gondii* devido ao contato e a ingestão de solo contaminado com oocistos desse parasito. Além disso, os vegetais contaminados pela exposição direta com fezes de gatos ou irrigação com água contaminada (DUMÉTRE et al., 2003) pode ser uma fonte de infecção para *A. fulica*, pois eles utilizam plantas como fonte de alimento.

Deve-se considerar que a presença de *T. gondii* em fezes de *A. fulica* pode ser um problema para saúde humana, pois estes podem contaminar frutas e verduras com suas fezes, possibilitando a transmissão dessa parasitose para o homem através da ingestão de frutas e verduras cruas, provenientes de áreas cultivadas contaminadas com fezes de desse molusco. Por outro lado, a malacofagia é comum em diferentes grupos de animais, sendo

relatados como predadores de *A. fulica*: sapos, rãs, besouros, aves, principalmente galinhas e marrecos (RAUT; BARKER, 2002), assim a presença de *T. gondii* nesses moluscos podem servir como fonte de infecção para diferentes espécies de animais.

Neste estudo não foi encontrada associação entre as variáveis climáticas e a presença de DNA compatível com *T. gondii* em fezes desse molusco. No entanto, houve uma diferença significativa entre o comprimento total da concha e massa corporal com a presença DNA, mostrando que animais maiores podem estar mais frequentemente infectados com este parasito. Os caramujos maiores são mais errantes, e provavelmente tem maior exposição aos parasitos, assim como tiveram mais tempo para aumentar a chance de infecção.

Apesar deste estudo não constatar associação significativa entre as variáveis epidemiológicas e a ocorrência de DNA compatível com *T. gondii* em fezes de *A. fulica*, sabe-se que nos locais com baixa infraestrutura sanitária, presença de gatos, bem como suas fezes pode ser fatores determinantes para a presença do parasito no molusco.

Dessa forma, é importante determinar a natureza dos parasitos encontrados nas fezes desse molusco, bem como a viabilidade dos mesmos, para definir o verdadeiro papel da *Achatina fulica* na cadeia epidemiológica de enfermidades como a criptosporidiose e a toxoplasmose. Além disso, a detecção de *amplicons* compatíveis com *Cryptosporidium* e *T. gondii* nestes caramujos nos permite sugerir que estes animais sejam usados como biomarcadores para monitoramento da contaminação ambiental do solo por protozoários de caráter zoonótico.

Este estudo registra pela primeira vez no mundo a presença de DNA compatível com *T. gondii* em fezes de *A. fulica*. Estes caramujos podem então servir como vetores mecânicos de *T. gondii*, constituindo-se um risco potencial para o homem e os animais.

Conclusões

1. A técnica de *nPCR* permitiu verificar a presença de DNA compatível com *Cryptosporidium* ssp. em amostras de fezes de *Achatina fulica*;

2. A presença de DNA compatível com *T. gondii* em *Achatina fulica* foi documentada neste estudo, representando o primeiro relato desse protozoário em caramujos no Brasil e no mundo;

3. Não houve associação significativa entre presença de DNA compatível com *T. gondii* nas fezes dos moluscos estudados e as variáveis climáticas e epidemiológicas;

4. Houve uma associação entre a massa corporal e o comprimento total da concha de *A. fulica* com a presença de DNA compatível com *T. gondii*.

Agradecimentos

Ao Dr. Luiz Fernando Pinta Gondim e ao doutorando Müller Ribeiro Andrade do Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais da UFBA-BA, pelas cepas de *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona*; ao Dr. Rodrigo Costa da Silva e Dr. Helio Langoni, do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado às Zoonoses da UNESP/Botucatu-SP, pela padronização do protocolo de extração para as fezes e pela cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Ao Laboratório de Doenças Parasitárias da USP-SP, pelas amostras de fezes de cães com *Cryptosporidium canis*. Os autores agradecem ao Laboratório de Entomologia (LENT-UEFS) e ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia pelo suporte físico e a CAPES, FAPESB e CNPq pela concessão de bolsas de estudo e suporte financeiro durante a pesquisa. Agradecemos aos funcionários e estagiários do laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia da UEFS e aos membros do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública pelo apoio durante a realização da fase experimental.

Referências

AFONSO, E.; THULLIEZ, P.; GILOT-FROMONT E. Local meteorological conditions, dynamics of seroconversion to *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*) and oocyst burden in a rural environment. **Epidemiology & Infection**, v. 139, n. 8, p. 1105-1113, 2010.

AMARANTE, H. M. B. **Ocorrência do *Cryptosporidium* sp. em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes em Curitiba**. 122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007. 364p.

AZEVEDO, D.S.; JAMRA, L.M.; RIBEIRO, M.F. Isolamento de oocistos de *Toxoplasma gondii* em dois bairros de Recife (PE). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 31-36, 1983.

BETTIOL, S.S.; OBENDORF, D.L.; NOWARKOWSKI, M.; MILSTEIN, T.; GOLDSMID, J.M. Earthworms as paratenic hosts of Toxoplasmosis in eastern barred bandicoots in Tasmania. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 1, p. 145-148, 2000.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/> Acesso em: 18 de janeiro de 2013.

CAREY, C.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporium hominis* oocyst. **Water Research**, v. 38, n. 4, p. 818-862, 2004.

CHINCHILLA, M.; GUERRERO, O.M.; CASTRO, A.; SABAH, J. Cockroaches as transport host of the protozoan *Toxoplasma gondii*. **Revista Biología Tropical**, v. 42, n. 2, p. 329-331, 1994.

COUTINHO, S.G.; LOBO, R.; DUTRA, G. Isolation of toxoplasma from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in rural área in Brazil. **Journal Parasitology**, v. 68, n. 54, p. 866-888, 1982.

DA SILVA, R.C.; SU, C. LANGONI, H. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 4, p. 332-336, 2009.

DABRITZ, H.A.; ATWILL, E.R.; GARDNER, I.A.; MILLER, M.A.; CONRAD, P.A. Outdoor fecal deposition by free-roaming cats and attitudes of cat owners and nonowners toward stray pets, wildlife, and water pollution. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 1 p. 74-81, 2006.

- DADO, D.; IZQUIERDO, F.; VERA, O.; MONTOYA, A.; MATEO, M.; FENOY, S.; GALVÁN, A. L.; GARCÍA, S.; GARCÍA, A.; ARÁNGUEZ, E.; LÓPEZ, L.; DEL ÁGUILA, C.; Miró G. Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. **Zoonoses Public Health**, v. 59, n. 1, p. 23-28, 2012.
- DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 207-227, 2005.
- DEAN, A. G.; ARNER, T. G.; SUNKI, G. G.; FRIEDMAN, R.; LANTINGA, M.; SANGAM, S.; ZUBIETA J. C.; SULLIVAN, K. M.; BRENDEL, K. A.; GAO, Z.; FONTAINE, N.; SHU, M.; FULLER, G.; SMITH, D. C.; NITSCHKE, D. A.; FAGAN, R. F. **Epi Info™, a Data Base and Statistics Program for Public Health Professionals**. CDC, Atlanta, GA, USA, 2011.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis- a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 57-72, 2004.
- DUMÉTRE, A.; DARDÉ, M. L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples?. **Microbiology Reviews**, v. 27, n. 5, p. 651-661, 2003.
- FALCHI, R. L. R. **Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.
- FAYER, R. *et al.* Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 13, p. 1305-1322, 2000.
- FERGUNSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133-148, 2009.
- FISCHER, M. L.; AMADIGI, I. S. N. História natural da *Achatina fulica*. In: FISCHER, M. L.; COSTA, L. C. M. (Org(s)). **O Caramujo Gigante Africano *Achatina fulica* no Brasil**. Curitiba: Ed. Champagnat, 2010. p. 49-99.
- FRENKEL, J. K.; RUIZ, A.; CHINCHILLA, M. Soil survival of *toxoplasma* oocysts in Kassas and Costa Rica. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 2, p. 439-443, 1975.
- GRAEFF-TEIXEIRA, C. Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 8, p. 743-744, 2007.
- GRECA, M. P. S. Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e região metropolitana. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) Universidade Federal do Paraná, 2010, p. 97.**

HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.

O'DONOGHUE, P.J. Cryptosporidium and Cryptosporidiosis in Man and Animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

OTERO, P.N. MUÑOZ, N.S.; STANLEY, B.S. GOSH, M.C.M. ROSALES, J.L. *Cryptosporidium parvum* en gastrópodos silvestres como bioindicadores de contaminación fecal ecosistemas terrestres. **Revista Chilena de Infectología**, v. 27, n. 3, p. 211-218, 2010.

PEREIRA, C.R.A.; FERREIRA, A.P. KOIFMAN, R.J. Detecção de *Cryptosporidium parvum* em alfaces frescas para o consumo cru. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. **Gala Scientia**, v. 2, n. 2, p. 31-36, 2008.

RAUT, S. K; BARKER, G.M. *Achatina fulica* Bowdich and others Achatinidae pest in tropical agriculture. In: BARKER, G. (Org). **Mollusks as croup pest**. New Zealand: CAB Publishing, 2002. p. 55-114.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 1. Ed. Rio de Janeiro.

SANTOS, T.R.; NUNES, C.M.; LUVIZOTTO, M.C.R.; MOURA, A.B.; LOPES, W.D.Z.; COSTA, A.J.; BRESCIANI, K.D.S. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public school. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 2, p. 53-57, 2010.

SCHIFFLER, C.L.; GOMES, F.F.; EDERLI, N.B.; OLIVEIRA, F.C.R. *Achatina fulica* Bowdich (1822) um novo hospedeiro de espécies de *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 273-276, 2008.

SILVA, S. O.S.; RICHTZENHAIN, L.J.; BARROS, I.N.; GOMES, A.M.M.C.; SILVA, A.V.; KOZERSKI, N.D.; CERANTO, J.B.A.; KEID, L.B. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. **Experimental Parasitology**, v. 135, n.3, p. 551-557, 2013.

SINSKI, E.; BEHNKE, J. M. Apicomplexan parasites: environmental contamination and transmission. **Polish Journal of Microbiology**, v. 53, n.1, p. 67-73, 2004.

SLIFKO, T. R.; SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 13, p. 1379-1393, 2000.

SLOSS, M.W.; ZAJAC, A.M.; KEMP, R.L. **Parasitologia Clínica Veterinária**. São Paulo: Manole. 1999. 198p.

TENTER, A. M.; HECHEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 13, p. 1217-1258, 2000.

TOMIYAMA, K. Age Dependency of sexual role and reproductive ecology in a simultaneously hermaphroditic land snail, *Achatina fulica* (Stylommatophora: Achatinidae). **Venus**, v. 60, n. 4, p. 273-283, 2002.

VASCONCELLOS, M. C.; PILE E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba. Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 6, p. 582-584, 2001.

WALLACE, G.D. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by cockroaches. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 126, n. 5, p. 545-547, 1972.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo relatou pela primeira vez a ocorrência do molusco *A. fulica* no município de Feira de Santana (BA) e a presença de nematódeos e DNA de protozoários parasitos de importância médica e veterinária associados ao molusco no estado da Bahia.

Em estudos futuros, devem-se realizar coletas mais amplas de amostras e aumentar a área amostral para caracterizar de forma definitiva a população de *A. fulica* presente no município de Feira de Santana, seja em suas características biológicas ou na influência dos fatores bióticos e abióticos nesta população. Ainda sugerimos aumentar a quantidade de amostras examinadas para a presença de parasitos, para inferir melhor sobre a influência destes na biologia e ecologia de *A. fulica* neste ambiente.

Em relação ao encontro de protozoários nas fezes de *A. fulica*, sugerimos proceder etapas de isolamento dos protozoários encontrados nas fezes desse gastrópode e realizar ensaios de infectividade animal, para compreender melhor o papel do molusco como vetores mecânicos desses protozoários.

São necessárias novas investigações sobre a ocorrência e o papel dessa espécie como hospedeiro intermediário de nematódeos e vetores de protozoários no município estudado, e ressaltamos a necessidade de vigilância sanitária por parte das autoridades de saúde do município, de forma impedir novos focos de infestação desse gastrópode e casos humanos de doenças associados a estes parasitos.

REFERÊNCIAS

- ALHO, C. J.R. Oxyurata de lagartos do Planalto Central. Sobre o gênero *Strongyluris* Muller, 1894 com descrição de duas espécies novas (Nematoda, Subuluroidea). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 29,n.3, p. 65-74, 1969.
- AMARANTE, H. M. B. **Ocorrência do *Cryptosporidium* sp. em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes em Curitiba**. 1992. 122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 607-623, 2000.
- BOWMAN, D.D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8 ed. Barueri, SP: Manole, 2006. 442p.
- CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.; GOVEIA, C.O.; LENZI, H.L.; GRAEFF-TEXEIRA, C.; LIMA, W.S.; MOTA, E.M.; PECORA, I.L.; MEDEIROS, A.M.Z.; CARVALHO, O.S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis*(Chen,1935) (Nematodo: Metastrongylidae) in Brazil.**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007.
- CAREY, C.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporium hominis* oocyst. **Water Research**, v.38, n.4, p.818-862, 2004.
- CÉSPEDE, R.; SALAS, J.; MEKBEL, S.; TROPER,L.; MULLNER, F.; MORERA,P. Granulomas entéricos y linfáticos com intensa eosinofilia tisular producidos por um estrombilídeo(*Strongylatra*). **Acta Médica Costarricense**, v.10, n.3, p.235-255.
- COSTA, L.C.M. Comportamento da *Achatina fulica*. In: FISCHER, M.L.; COSTA, L.C.M. (Org (s)). **Caramujo Gigante *Achatina fulica* no Brasil**. Curitiba: Ed. Champagnat, 2010. P. 141-174.
- COSTA, M. B. ***Achatina fulica* e a saúde pública**. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências humanas e Naturais./ Departamento de Ciências Biológicas. 2006. Disponível em < <http://www.ufes.br>> acesso em 24 mai.2013.
- DUARTE, E. R.; MELO, M. M.; HAMDAN, J.S.Epidemiological aspects of bovine parasitic otitis caused by *Rhabditis* spp. and/or *Raillietiaspp*.in the state of Minas Gerais, Brazil.**VeterinaryParasitology**, v. 101, n. 1, p. 45-52, 2001.
- DUBEY, J. P.; MILLER, S.; POWELL, E. C.; ANDERSON, W. R. Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii*-induced abortatios. **Journal American Veterinary Medical Associations**, v. 11, n. 2, p. 155-158, 1986.
- DUBEY, J.P. Review of toxoplasmosis of animals and humans.**Parasites e Vectors**, v.3, n.1, p.112, 2010.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis- a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n.2, p.57-72, 2004.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n.1, p.1-32, 1998.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.11, p.1257-1278, 2008.

DUMÉTRE, A.; DARDÉ, M.L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples?. **Microbiology Reviews**, v.27, n.5, p.651-661, 2003.

FALCHI, R. L. R. **Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS.** 2006.90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v.126, n. 2, p. 37-56, 2004.

FAYER, R. *et al.* Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

FERREIRA, A. M.R.; SOUZA-DANTAS, L.M.; LABARTHE, N. Reporto of case of *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) in domestic cat in Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 24-26, 2006.

FISCHER, M. L.; AMADIGI, I. S.N. História Natural da *Achatina fulica*. In: FISCHER, M. L.; COSTA, L. C. M. (Org(s)). **O Caramujo Gigante Africano *Achatina fulica* no Brasil**. Curitiba: Ed. Champagnat, 2010. p. 49-99.

FISCHER, M.L.; COLLEY, E. Diagnóstico da ocorrência do caramujo gigante africano *Achatina fulica* Bowdich, 1822 na APA de Guaraqueçaba. **Estudos de Biologia**, v.26, n.54, p.43-50, 2004.

FISCHER, M.L.; COLLEY, E. Espécie insavora em reservas naturais: Caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca-Achatinidae) na ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, n.1, p. 127-144, 2005.

FISCHER, M.L.; COLLEY, E.; AMADIGI, I.S.N.; SIMIÃO, M.S. Ecologia de *Achatina fulica*. In: FISCHER, M.L.; COSTA, L.C.M. (Org (s)). **Caramujo Gigante *Achatina fulica* no Brasil**. Curitiba: Ed. Champagnat, 2010. p. 102-140.

FISCHER, M.L.; COSTA, L.C.M.; BONATO, D. Utilização de recursos alimentares no ambiente antrópico pelo caramujo gigante africano *Achatina fulica* Bowdich, 1822: subsídeos para o manejo. **Bioikos**, v.22, n.2, p.81-90, 2008.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3.ed. São Paulo. Editora Ícone, 1997. 686 p.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. Ed. São Paulo: Editora Ícone, 2004.608p.

FRANCO-ACUÑA, D.O.; PINHEIRO, J.; TORRES, E.J.L.; LANFREDI, R.M.; BRANDOLINI, S.V.P.B. Nematode cysts and larva found in *Achatina fulica* Bowdich, 1822. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.100, n. 2, p.106-110, 2008.

FRENKEL, J.K.; RUIZ, A.; CHINCHILLA, M. Soil survival of *toxoplasma* oocysts in Kassar and Costa Rica. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.24, n.2, p.439-443, 1975.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, n. 8, p.743-744, 2007.

GRECA, M.P.S. **Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e região metropolitana**. 2010.97f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, 2010.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n.10, p. 634-640, 2002.

KAMINSKY, R.; CABALLERO, R.; ANDREWS, K. Presencia de *Angiostrongylus costaricensis* en Honduras y sus relaciones agro-ecológicas y humanas. **Parasitología al Día**, v.19, n.1, p.81-90, 1995.

LEVINE, N. D. **Nematode Parasite of Domestic Animals and Man**.2 ed. Editora: Burgess Publishing Co, 1980. 477p.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX,G.; GRAIN,J.; HONIGBERG,B.M, LEEDALE, G.F.; LOM, J.; LYNN, D.;MERINFELD, E.G.;PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G.A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P. Feline toxoplasmosis and the *Toxoplasma gondii* oocyst. **The Compendium for the Continuing Education**, v.19, n.4, p.448-461, 1997.

LORENZI, A. T.; MARTINS, M.F. Análise colorimétrica e espectroscópica do muco de caracóis terrestres *Achatina sp.* alimentados com ração diferenciada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 572-579, 2008.

Martins Jr, W.; Nunes, I.J.;Ribeiral, L.A.; Rosaz, C.E.E.; Nunes, V.A. Nota sobre a ocorrência de *Rhabditidae* (*Nematoda*, *Rhabditida*) relacionados com otite em bovinos na região geoeconômica de Brasília. **Ciência e Cultura**, v.23, n. 1 p.248–249, 1971.

MEAD, A.R. **The giant African snail**: a problem in economic malacology. Chicago: University of Chicago Press, 1961. p. 257.

MONIS, P.T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 233-244, 2003.

MORERA, P.; LAZO, R.; URQUIZO, J.; LLAGUNO, M. First record of *A. costaricensis* Morera and Cespedes, 1971 in Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 6, p. 1460-1461, 1983.

MORERA, P.; CÉSPEDES, R. Angiostrongilosis abdominal. Una nueva parasitosis humana. **Acta Médica Costarricense**, v. 14, n. 5, p. 159- 173, 1971.

MORGAN, E.SHAU, S. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs: continuing spread and developments in diagnosis and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, n.12, 2010.

MOTTA, E.; LENZI, H. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, n.6, p.707-709, 1995.

MYERS, P., R.; ESPINOSA, C. S.; PARR, T. JONES, G. S.; HAMMOND, T. A. Dewey.2012. **The Animal Diversity Web** (online). Disponível em < <http://animaldiversity.org>>. Acesso em 10 de junho de 2012.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 494 p.

NOMURA, S.; LIN.H. First clinical case of *Hemostrongylus ratti*. **Journal of Tropical Medicine e Hygiene**, v.13, n.1, p.589-590.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

OLIVEIRA, A.P.M.; TORRES, E.J.L.; MALDONADO JÚNIOR, A.; ARAÚJO, J.L.B.; FERNANDEZ, M.A.; THIENGO, S.C. *Achatina fulica* como hospedeiro intermediário de nematódeos de interesse médico-veterinário em Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 3, p. 199-210, 2010.

PEREIRA, J.T. **Métodos de desinfecção em água contendo *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) e sua detecção por técnica de biologia molecular**. 2007.89f. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) Universidade do Paraná, 2010.

PEREIRA, J.T., COSTA, A.O., OLIVEIRA SILVA, M.B., SCHUCHARD, W., OSAKI, S.C., CASTRO, E.A., PAULINO, R.C., THOMAZ SOCCOL, V. Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Parana

state, Southern Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v 151, n.2-3, p. 464-473, 2008.

RAUT, S. K.; BARKER, G.M. *Achatina fulica* Bowdich and others Achatinidae pest in tropical agriculture. In: BARKER, G. (Org). **Mollusks as croup pest**. New Zealand: CAB Publishing, 2002.p. 55-114.

SCHIFFLER, C.L.; GOMES, F.F.; EDERLI, N.B.; OLIVEIRA, F.C.R. *Achatina fulica* Bowdich (1822) um novo hospedeiro de espécies de *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 273-276, 2008.

SCOFIELD, A.; MADUREIRA, R. C.; OLIVEIRA, C.J. F.; GUEDS Jr, D. S.; SOARES, C. O.; FONSECA, A. H. Diagnóstico pós-morte de *Aelurostrongylus abstrusus* e caracterização morfológica de ovos e mórulas por meio de histologia e impressão de tecido. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 952-955, 2005.

SLIFKO, T. R.; SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 13, p. 1379-1393, 2000.

SMITH, H.V.; CACCIÓ, S.M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and Giardia as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 2, p. 29-40, 2007.

SPEER, C.A.; CLARK, S.; DUBEY, J.P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, n.2, p.267-299, 1998.

TELES H. M. S.; VAZ, J. F.; DOMINGOS, M.D. Occurrence of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) in Brazil: Intermediate snail host of angiostrongyliasis. **Revista Saúde Pública**, v. 31, n. 3, p. 310-312, 1997.

TELES, H. M. S; FONTES, L. R. Implicações da Introdução e dispersão de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 no Brasil. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v. 12, n. 1, p. 3-25, 2002.

TENTER, A. M.; HECHEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.13, p.1217-1258, 2000.

THIENGO, S.C. Infestação de *Achatina fulica* no Brasil: aspectos relacionados à saúde humana e animal. In: XXI Encontro Brasileiro de Malacologia, 2009, Rio de Janeiro. **XXI Encontro Brasileiro de Malacologia**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2009. 467p.

THIENGO, S.C.; FARACO, F.A.; SALGADO, N.C.; COWLE, R.H.; FERNANDEZ, M.A. Rapid spread of invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brazil. **Biological Invasions**, v. 9, n. 6, p. 693-702, 2007.

THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.A. Gastrópodes Neotropicais Continentais de Importância Médica. In: COURO, J.R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2013. p. 2080.

THIENGO, S.C.; SIMÕES, O.R.; FERNANDEZ, M.A.; MALDONADO-JÚNIOR, A. *Angiostrongylus cantonensis* and Rat Lungworm Disease in Brazil. **Journal of medicine & public health**, v. 72, n. 6, p. 18-22, 2013.

THIENGO, S.C.; SIMÕES, O.R.; FERNANDEZ, M.A.; MALDONADO-JÚNIOR, A. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. **Journal of medicine & public health**, v.72, n.6, p.18-22, 2013.

THIENGO, S.C; FERNANDEZ, M.A; TORRES, E.J.L; COELHO, P.M; LANFREDI, R.M.First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aerulostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina (Lissaachatina) fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil.**Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 1, 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; FERNANDES, 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, n. 3, p. 194-199, 2010.

TOMIYAMA, K. Age dependency of sexual role and reproductive ecology in a simultaneously hermaphroditic land snail, *Achatina fulica* (Stylommatophora: Achatinidae). **Venus**, Tokyo, v.60,n.4, p.273-283, 2002.

TOMIYAMA, K. Courtship behaviour of the giant African snail, *Achatina fulica* (Férussac) (Stylommatophora; Achatinidae) in the field. **Journal of Molluscan**, v.60, n.10, p.47-54, 1994.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. 273 p.

VASCONCELLOS, M. C; PILE, E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba. Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35. n. 6, p. 582-584, 2001.

VIEIRA, F.P. **Correlação entre a vulnerabilidade de aquíferos e a prevalência da Toxoplasmose humana e animal em Campos Goytacazes- região norte do estado do Rio de Janeiro**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2010.

ANEXO A - Autorização para atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 35442-1	Data da Emissão: 31/07/2012 16:49
Dados do titular	
Nome: Patrícia Hercília Arcanjo de Almeida	CPF: 087.683.496-96
Título do Projeto: Avaliação da presença de <i>Achatina fulica</i> BOWDICH, 1822 (GASTROPODA: PULMONATA) e estudo de helmintos e protozoários associados, em Feira de Santana, Bahia	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA	CNPJ: 14.045.546/0001-73

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coletas	08/2012	08/2013
2	exames parasitológicos	08/2012	10/2013
3	entrega do relatório parcial FAPESB	02/2013	02/2013
4	Apresentação de resumo em eventos	03/2013	03/2013

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Aristeu Vieira da Silva	Pesquisador	159.508.308-14	19989346 SSP-SP-SP	Brasileira
2	SOFIA ALINE AMARAL SANTOS	mestranda	565.132.675-87	0715724304 ssp-BA	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	FEIRA DE SANTANA	BA	zona urbana de Feira de Santana	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93448756



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 35442-1	Data da Emissão: 31/07/2012 16:49
Dados do titular	
Nome: Patrícia Hercília Arcanjo de Almeida	CPF: 087.683.496-96
Título do Projeto: Avaliação da presença de Achatina fulica BOWDICH, 1822 (GASTROPODA: PULMONATA) e estudo de helmintos e protozoários associados, em Feira de Santana, Bahia	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA	CNPJ: 14.045.546/0001-73

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Achatina fulica (*Qtde: 100)
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Achatina fulica

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados)	Coleta manual
---	--	---------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93448756



Página 2/3

ANEXO B- Protocolo de extração de DNA de larvas de nematóides usando *kit PureLink®*

Genomic DNA

Preparação

1. Adicione etanol PA aos frascos *PureLink® Genomic Wash Buffer 1* e *PureLink® Genomic Wash Buffer 2* de acordo com as instruções das etiquetas dos frascos. Misture bem e mantenha à temperatura ambiente.
2. Ligar o banho-seco à 55°C;

Preparando o lisado de amostra

1. Ressuspender as larvas em 200 µL de tampão fosfato (PBS);
2. Adicionar 20 µL de proteinase K;
3. Adicionar 20 µL de RNase A;
4. Homogeneizar no vórtex;
5. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos;
6. Adicionar 200 µL do *PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer*;
7. Homogeneizar no vórtex;
8. Incubar a 55°C por 10 minutos para promover a digestão proteica;
9. Adicionar 200 µL de etanol PA ao lisado;
10. Homogeneizar no vórtex por 5 segundos para obter uma solução homogênea;

Ligando o DNA

1. Transfira cerca de 640 µL do lisado para uma coluna *PureLink® Spin* com um *Collection Tube*;
2. Centrifugue a 10.000g por um minuto a temperatura ambiente;
3. Descarte o *Collection Tube* e transfira a coluna para um *Collection Tube* limpo;

Lavando o DNA

1. Adicione 500 µL de *Wash Buffer 1* preparado com etanol à coluna;
2. Centrifugue a coluna a temperatura ambiente a 10.000g por um minuto;
3. Descarte o *Collection Tube* e transfira a coluna para um *Collection Tube* limpo;
4. Adicione 500 µL de *Wash Buffer 2* preparado com etanol à coluna;

5. Centrifugue a coluna a temperatura ambiente na velocidade máxima por três minutos;
6. Descarte o *Collection Tube*;

Eluindo o DNA

1. Transfira a coluna para um microtubo de 1,5 mL estéril;
2. Adicione 100 µL de *PureLink® Genomic Elution Buffer* à coluna;
3. Incubar à temperatura ambiente por 1 minuto;
4. Centrifugar a coluna na velocidade máxima por 1 minuto à temperatura ambiente; o tubo contém o DNA genômico purificado;
5. Para recuperar mais DNA, execute uma segunda eluição, usando 100 µL de *PureLink® Genomic Elution Buffer* à coluna, usando um novo microtubo estéril; centrifugue à máxima velocidade por 1,5 minutos à temperatura ambiente; o tubo contém DNA genômico purificado.

Armazenando o DNA

1. Armazene o DNA purificado à -20°C ou utilize o DNA para as aplicações desejadas.
2. Para armazenamento de longo tempo, armazene o DNA purificado em *PureLink® Genomic Elution Buffer* a -20°C.
3. Para evitar congelamentos e descongelamentos sucessivos, armazene o DNA purificado a 4°C para uso imediato ou faça alíquotas e estoque a -20°C por longos períodos.

APÊNDICE A – Recuperação e identificação de nematódeos em *Achatina fulica*

Método de digestão artificial de *A. fulica* em ácido clorídrico 0,7%

1. Embrulhar os caramujos em papel (identificar no papel o número correspondente do molusco), para que se possa evitar que o muco se espalhe quando as conchas forem quebradas;
2. Quebrar a concha com auxílio de um martelo;
3. Cortar a parte mole do molusco em pequenos pedaços, com auxílio de uma pinça e uma tesoura;
4. Colocar os fragmentos de tecido frasco contendo solução de HCl a 0,7%;
5. Manter em repouso por 6 horas em temperatura ambiente;
6. Transferir a suspensão para aparelho de Baermann e acrescentar água destilada até cobrir os fragmentos cortados;
7. Manter por pelo menos 12 horas;
8. Proceder a identificação das larvas de nematódeos.

Pesquisa de larvas de nematódeos

1. O sedimento deverá ser recolhido do funil e colocado em tubo de falcon de 15 ml;
2. Centrifugar a 650g por cinco minutos;
3. Avaliar o sobrenadante e desprezar; diluir o sedimento em água;
4. Transferir o sedimento diluído para placa de Petri e examinar ao microscópio estereoscópico para o estudo da morfologia e identificação;

5. As larvas devem ser capturadas e colocadas em lâminas e levadas para uma placa aquecedora e, em seguida observadas no microscópio sob objetiva de 40x;
6. Após a identificação as larvas de nematódeos poderão ser fixadas em álcool com concentração superior 70% (para estudos moleculares) ou em solução de Railliet-Henry ou A.F.A aquecida (para análise morfológica);
7. Armazenar em tubos identificados quanto à identificação (gênero) e a solução fixadora.

Identificação de nematódeos em microscópio estereoscópico no meio líquido

Movimentação rápida, movimento retilíneo, larva alongada com cauda longa e fina _____ Gênero *Rhabditis* sp.

Larva vista a olho nu, movimentação lenta, serpentiforme, corpo grande largo _____ Gênero *Strongyluris* sp.

Movimentação lenta, em forma de "S" giro entorno do próprio corpo, geralmente em formato de rosca ou oito _____ Família *Metastrongylidae*.

Identificação de nematódeos em microscópio (Larvas fixadas observadas sob lâminas em objetiva 40x)

Larvas espessas e curtas, bulbo esofágico nítido longo do tipo rabaditóide constituído de pseudobulbo, istmo e bulbo. Não é possível a visualização de primórdio genital. Adultos: vulva localizada na região mediana do corpo, ovários com aspectos segmentado indicando agrupamento celular característico, grande maioria apresentam útero com a presença de ovos larvados, cauda da bainha média longa e afilada. 1B) Adulto macho: nematódeo longo com presença de bolsa copulatória. 1C) Adulto fêmea: vulva localizada na região mediana do corpo, ovários com aspectos segmentado indicando agrupamento celular característico grande maioria

apresentam útero com a presença de ovos larvados, cauda e bainha média longa e afilada _____ Gênero *Rhabditis* sp.

Larvas curtas com aspecto em “C” após a fixação; 2 B) extremidade anterior arredondada, primórdio refringente da cápsula bucal relativamente longo, corpo filiforme, com extremidade curvada dorso-ventralmente, esôfago longo com bulbo filiforme, término do esôfago longo; 2 C) cauda com nítida presença do botão característico da espécie _____ *Aelurostrongylus abstrusus*.

Larvas curtas com aspecto em “C” após a fixação; 2 B) extremidade anterior arredondada, primórdio refringente da cápsula bucal relativamente longo, corpo filiforme, com extremidade curvada dorso-ventralmente, esôfago longo com bulbo filiforme poro excretor evidente, situado na região média do esôfago, e anel nervoso localizado na região mediana do esôfago, primórdio genital ventral está localizado na região do terço médio intestinal; 3 C) cauda com apêndice _____ Família Metastrongilídea.

Larvas longas e vistas a olho nu; 4 B) cápsula bucal curta; esôfago oxiuridiforme (único bulbo); 4 C) cauda curta _____ Gênero *Strongyluris* sp.

APÊNDICE B - Protocolo de extração de DNA de amostras de fezes

(adaptado das instruções para o kit *Multi-source Axygen*® AP-MN-MS-GDNA.

Preparativos

1. Ligar banho-maria (temperatura de 56°C) e banho seco (70°C);
2. Aliquotar 1 a 1,5 mL de *eluent/elution buffer* em microtubos de 1,5mL;
3. Incubar estes microtubos a 70°C e deixar assim até o final da extração;
4. Verificar se possui as quantidades suficientes de todos os reagentes;
5. Verificar se os reagentes não possuem contaminação;

Extração

6. Coletar de 0,05 a 0,20g de fezes sólidas ou de 50 a 200 ul de fezes líquidas;
7. Colocar em microtubos de 2 mL (vem com o kit);
8. Adicionar 350µL de PBS pH 7,2 ou de água ultrapura autoclavada;
9. Adicionar 10µL de proteinase K (vem com o kit);
10. Adicionar 0,9µL de RNase (vem com o kit);
11. Homogeneizar em vortex por 5 minutos ou até a solução estiver homogeneizada;
12. Incubar a 70°C/ 10 minutos;
13. Incubar em nitrogênio líquido por 5 minutos;
14. Incubar a 70°C/ 5 minutos;
15. Incubar em nitrogênio líquido por 5 minutos;
16. Incubar a 70°C/ 5 minutos;
17. Colocar os microtubos no gelo por 2 minutos;
18. Adicionar 150µL de *buffer C-L* (vem com o kit);
19. Adicionar 10µL de proteinase K;

20. Homogeneizar em vortex por 30 segundos;
21. Incubar a 56°C(banho-maria) por 15 minutos;
22. Mini-spin (centriguação) por 10 segundos para tirar as gotículas da tampa;
23. Abra as tampas cuidadosamente sem encostar na parte superior interna do microtubo;
24. Adicionar 350µL de *buffer P-D* (vem com o kit);
25. Centrifugar a 12.000 x g/10 minutos;
26. Preparar novos microtubos de 2 mL e montar as colunas nestes (vem com o kit);
27. Aspirar sobrenadante e colocar na coluna de filtração, dentro do microtubo de 2 mL;
28. Centrifugar a 12.000 x g/ 1 minuto;
29. Descartar o filtrado e retornar a coluna ao microtubo;
30. Adicionar 500µL de solução W1 (*wash buffer* - vem com o kit);
31. Centrifugar a 12.000 x g/ 1 minuto;
32. Descartar o filtrado e retornar a coluna ao microtubo;
33. Adicionar 700µL de solução W2 (*wash buffer* - vem com o kit; reparar se já foi adicionado etanol);
34. Centrifugar a 12.000 x g /1 minuto;
35. Descartar o filtrado, retornar a coluna ao microtubo;
36. **Repetir o procedimento acima:** adicionar 700µL de solução W2;
37. Centrifugar a 12.000 x g/ 1 minuto;
38. Descartar o filtrado, retornar a coluna ao microtubo e fechar o microtubo;
39. Centrifugar a 12.000 x g/ 1 minuto;
40. Preparar novos microtubos de 1,5mL para receber as colunas de filtração;
41. Transferir a coluna de filtração para os novos microtubos e descartar o anterior;

42. Adicionar de 100 a 200µL de *eluent/elution buffer* pré-aquecido a 70° C;
43. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
44. Centrifugar a 12.000 x g/ 1 minuto;
45. Descartar a coluna de filtração, fechar o microtubo e congelar até o momento da PCR.