

LANUZE ROSE MOZZER SOARES

*Angiostrongylus vasorum:*  
**Interação parasito, hospedeiros e ambiente**

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Helminologia.

Orientador: Dr. Walter dos Santos Lima

Belo Horizonte  
2014

Soares, Lanuze Rose Mozzer.

Angiostrongylus vasorum: interação parasito, hospedeiros e ambiente [manuscrito] / Lanuze Rose Mozzer Soares. – 2014.

83 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Walter dos Santos Lima.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Angiostrongylus vasorum – Teses. 2. Relações Hospedeiro-Parasita. 3. Interações hospedeiro-patógeno. 4. Cão - Infecção – Teses. 5. Parasitologia – Teses. I. Lima, Walter dos Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89

## RESUMO

*Angiostrongylus vasorum*, parasito do sistema cardiorrespiratório em canídeos, possui ciclo biológico heteroxênico em que os hospedeiros intermediários são moluscos terrestres e aquáticos. Geralmente, os canídeos são infectados pela ingestão dos hospedeiros intermediários ou de hospedeiros paratênicos que contêm larvas infectantes (L3). Este trabalho reúne quatro experimentos que foram divididos em capítulos. No capítulo 1 avaliou-se a sobrevivência das L1 no ambiente utilizando 207 amostras de 50 g de pool de fezes de cães infectados com *A. vasorum* sobre papel impermeável do tipo celofane em locais sob incidência de luz solar, em locais sombreados, em geladeira (4°C) e em freezer (-20°C). Concluiu-se que as L1 de *A. vasorum* suportam por maior período de tempo temperaturas mais baixas (4°C) em relação a temperatura ambiente (25°C) e a incidência solar direta sobre o bolo fecal estimula a migração das larvas e aumenta a mortalidade das mesmas. No capítulo 2 foi avaliado a susceptibilidade, o crescimento, a oviposição e o desenvolvimento larvário em 282 *P. canaliculata* infectados com 500 larvas de primeiro estágio (L1) de *A. vasorum*. A recuperação larvária variou de 38,2% a 65,9%, sendo que larvas de primeiro estágio (L1) foram encontradas até o 19º dpi, larvas de segundo estágio (L2) do 11º ao 25º dpi e larvas de terceiro estágio (L3) a partir do 19º dpi. Os moluscos infectados apresentaram maior número de ovos por desova. Entretanto, a taxa de eclosão e o tamanho da concha foram menores no grupo infectado em relação ao grupo controle. Este é o primeiro relato de infecção experimental de *P. canaliculata* por *A. vasorum*, confirmando a sua inespecificidade em relação ao hospedeiro intermediário e indicando a importância de levantamentos epidemiológicos direcionados ao parasito e este molusco. No capítulo 3 avaliou-se a susceptibilidade e a viabilidade de *Gallus gallus domesticus* como hospedeiro paratênico de *A. vasorum*, 17 frangos da linhagem Cobb foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Os animais do grupo A foram inoculados com L3 de *A. vasorum*, e os do grupo B ingeriram moluscos infectados com L3 de *A. vasorum*. Aos trinta dias pós-infecção, os frangos foram sacrificados, e os músculos e órgãos foram colocados numa solução de HCl-pepsina (1% de HCl (37%), 1% de pepsina) durante 3 horas em estufa a 40 ° C para recuperar L3. No grupo A, 1.863 L3 foram recuperadas por frango. No grupo B, 2585 L3 foram recuperadas. Um cão que ingeriu órgãos e tecidos de uma galinha do grupo A eliminou larvas de *A. vasorum* em suas fezes 51 dias após a infecção. Aos 107 dias iniciou-se o tratamento com doses diárias de fenbendazol

25 mg / kg durante 21 dias. A permanência de L3 viável por 30 dias e a infecção do cão indicam que *Gallus gallus* é um potencial hospedeiro paratênico para este parasito. No capítulo 4 foi analisado os aspectos parasitológicos da infecção na cadela gestante, avaliou-se a existência de anticorpos anti-*A. vasorum* no leite materno de cadelas infectadas e a cinética dos anticorpos anti-*A. vasorum* no soro dos seus respectivos filhotes. Além disso, avaliou-se a cinética de eliminação de larvas de primeiro estágio (L1) de *A. vasorum* nas fezes das cadelas nas fases de estro, gestação e lactação. Houve transferência de anticorpos anti- *A. vasorum* para os filhotes e estes diminuem ao longo do tempo em relação aos valores encontrados na genitora. Até os 45 dias ANF foram detectados anticorpos no soro de todos os filhotes e aos 90 dias ANF apenas 1 filhote apresentou reação ao antígeno. Após 105 dias não houve reação ao antígeno em nenhum dos soros dos filhotes. Nenhuma forma larvária foi detectada nas amostras de leite. O soro do leite apresentou anticorpos aos 15 dias ANF aos 30 dias ANF não foi detectado reação antígeno-anticorpo. Houve eliminação de L1 de *A. vasorum* nas fezes da cadela em todas as fases reprodutivas. Sendo que na segunda metade do período gestacional houve um aumento da quantidade de larvas nas fezes. Aumento este que coincidiu com o aumento dos níveis de prolactina nas cadelas gestantes.

## ABSTRACT

*Angiostrongylus vasorum*, parasite of the cardiorespiratory system in dogs, has heteroxenic biological cycle in which the intermediate hosts are terrestrial and aquatic molluscs. Generally, canids are infected by eating the intermediate hosts or paratenic hosts containing infective larvae (L3). This work brings together four experiments were divided into chapters. In Chapter 1 we evaluated the survival of L1 in the environment using 207 samples of 50 g of stool pool of dogs infected with *A. vasorum* on waterproof cellophane paper type in places under incidence of sunlight in shady locations, in the refrigerator (4 ° C) and freezer (-20 ° C). We conclude that the L1 *A. vasorum* support for a longer period of time at lower temperatures (4 ° C) with respect to room temperature (25 ° C) and the direct sunlight on the stool stimulates the migration of the larvae and increases mortality of the same . In Chapter 2 we study the susceptibility, growth, oviposition and larval development in 282 *P. canaliculata* infected with 500 first stage larvae (L1) of *A. vasorum*. The larval recovery ranged from 38.2% to 65.9%. L1 were found until 19 dpi, larvae of the second stage (L2) of 11 to 25 dpi and third stage larvae (L3 ) from 19 dpi. The infected snails had higher number of eggs per clutch. However, the rate of onset and the size of the shell were lower in the infected group compared to the control group. This is the first report of experimental infection of *P. canaliculata* by *A. vasorum*, confirming its specificity in relation to the intermediate host and indicating the importance of epidemiological surveys targeted to the parasite and this mollusk. In chapter 3 we evaluated the susceptibility and the feasibility of *Gallus gallus domesticus* as paratenic host of *A. vasorum*, 17 chickens from Cobb were randomly divided into two groups. The animals in group A were inoculated with L3 of *A. vasorum*, and group B ate snails infected with L3 of *A. vasorum*. At thirty days post-infection the chickens were sacrificed and the muscles and organs were placed in a pepsin-HCl solution (1% HCl (37%), 1% pepsin) for 3 hours in an oven at 40 ° C for L3 recover. In group A, 1,863 L3 were recovered by chicken. In group B, 2585 L3 were recovered. A dog that ingested organs and tissues of a group of chicken eliminated the larvae of *A. vasorum* in their feces 51 days after infection. After 107 days began the treatment with fenbendazole daily doses of 25 mg / kg for 21 days. The L3 to remain viable for 30 days and the infection dog indicate that *Gallus gallus* is a paratenic potential host for this parasite. In Chapter 4 was analyzed parasitological aspects of the infection in pregnant bitch, we evaluated the existence of anti-*A. vasorum* antibodies in

the breast milk of infected dogs and the kinetics of anti-*A. vasorum* antibodies in the serum of their pups. In addition, we evaluated the elimination kinetics of first stage larvae (L1) of *A. vasorum* in the feces of dogs in the estrus phase, pregnancy and lactation. There was transfer of anti- *A. vasorum* for puppies and these decrease over time in relation to the values found in mothers'. By 45 days after birth of puppies (ABP) antibodies were detected in the serum of all pups at day 90 and only 1 chick presented ABP response to the antigen. After 105 days there was no reaction to the antigen in the sera of pups. No larval form was detected in milk samples. The whey showed antibodies at 15 days ABP and at 30 days was not detected antigen-antibody reaction. There was elimination of L1 *A. vasorum* in bitch feces in all reproductive phases. Since the second half of pregnancy was an increase in the number of larvae in the feces. This increase coincided with the increase in prolactin levels in pregnant bitches.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Angiostrongylus* possui dezessete espécies descritas: *Angiostrongylus vasorum*, *Angiostrongylus gubernaculatus*, *Angiostrongylus chabaudi*, *Angiostrongylus taterone*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus sciuri*, *Angiostrongylus mackerrasae*, *Angiostrongylus sandarsae*, *Angiostrongylus petrowi*, *Angiostrongylus dujardini*, *Angiostrongylus schmidtii*, *Angiostrongylus costaricensis*, *Angiostrongylus malaysiensis*, *Angiostrongylus ryjikovi*, *Angiostrongylus siamensis*, *Angiostrongylus morerae*, *Angiostrongylus lenzii*.

Destas, três espécies possuem interesse médico e médico veterinário: *A. cantonensis*, *A. costaricensis* e *A. vasorum*. (Souza et al. 2009). *A. cantonensis* é parasito do sistema circulatório de roedores que ocasionalmente pode parasitar humanos, levando a um quadro de meningite eosinofílica. As larvas migram para o sistema nervoso central, onde podem se desenvolver até a fase adulta, e a migração ou morte destes parasitos desencadeia um processo inflamatório. Os sintomas mais comuns são dor de cabeça, náuseas e febre. (Alicata 1988, Sawanyawisuth 2009).

*A. costaricensis* parasita o plexo mesentérico de roedores, ao infectar acidentalmente o homem, causa a angiostrongilose abdominal. A infecção pode ser assintomática ou apresentar sintomas leves e em casos mais severos pode-se observar dor abdominal intensa, comprometimento vascular, infiltrado inflamatório, trombose e necrose. Complicações como peritonite por perfuração intestinal, úlceras e hemorragias podem ocorrer. (Incanni 2007, Rodriguez et al. 2008).

*A. vasorum* é um parasito da artéria pulmonar e suas ramificações e do ventrículo direito de canídeos domésticos e silvestres (Dodd 1973, Prestwood et al. 1981). Animais de outras famílias como texugo (*Meles meles*), lontra (*Lutra lutra*), furão (*Mustela erminea*) e panda-vermelho (*Ailurus fulgens fulgens*) já foram descritos com infecções naturais (Patterson-Kane et al. 2009, Gerrikagoitia et al. 2010, Simpson 2010). A patologia e as manifestações clínicas são múltiplas estando relacionadas com o desenvolvimento e localização do parasito nos órgãos infectados (Dodd 1973, Prestwood et al. 1981, Ramsey et al. 1996, Brennan et al. 2004). Os hospedeiros definitivos podem apresentar sinais clínicos como, insuficiência respiratória e coagulopatia (Cury & Lima 1996, Curry et al. 2002, Helm et al. 2009, Chapman 2006). No entanto, pouco se sabe sobre a evolução da doença no cão o que dificulta a intervenção clínica nos casos.

Apesar de ainda não terem sido relatados casos em humanos infectados por *A. vasorum*, a possibilidade não pode ser descartada.

O diagnóstico da angiostrongilose canina é confirmado através do encontro de larvas de primeiro estágio (L1) nas fezes de cães infectados, porém, a irregularidade da eliminação das larvas nas fezes dificulta o diagnóstico, o que torna necessário a utilização de novas técnicas como a Reação de cadeia Polimerase (PCR) para identificar o DNA parasitário em cão infectado (Helm et al. 2009) e o ELISA, utilizado para detectar anticorpos anti-*A. vasorum* (Schnyder et al. 2011).

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 - Histórico e Distribuição Geográfica

O primeiro relato do parasito foi feito na França por Serres (1854), que relatou o encontro do nematoide no sistema circulatório de um cão que morreu subitamente e foi necropsiado na cidade de Toulouse.

A partir de então, relatos desse helminto parasitando cães ou canídeos silvestres vêm sendo catalogados em regiões da Austrália (Roberts 1940), Espanha (Acedo et al. 1979, Segovia et al. 2001), Itália (Poli et al. 1984, Traversa et al. 2008, Lepri et al. 2011, Tieri et al. 2011, Di Cesare et al. 2011, Traversa et al. 2013, Guardone et al. 2013), Dinamarca (Willingham 1996, Saeed 2006, Jessen et al. 2010, Jefferies et al. 2010, Gredal et al. 2011, Al-Sabi et al. 2013), Grã Bretanha (Morgan et al. 2010), Reino Unido (Jefferies et al. 2010, Schnyder et al. 2013), Canadá (Perry et al. 1991, Jefferies et al. 2010), Holanda (Jefferies et al. 2010), Irlanda (Jefferies et al. 2010, Gallagher et al. 2012), Escócia (Helm et al. 2009), Alemanha (Jefferies et al. 2010, Schnyder et al. 2011, Schnyder et al. 2013), Hungria (Majoros et al. 2010), Polônia (Schnyder et al. 2013) Eslováquia (Hurníková et al. 2013) e África (Bwangamoi, 1972). O *A. vasorum* apresenta distribuição cosmopolita e as regiões do mediterrâneo, Irlanda, Alemanha, sudoeste da França e sudoeste da Inglaterra são as principais áreas enzoóticas desse nematoide (Barutzki & Schaper 2003, Chapman et al. 2004, Brennan et al. 2004, Nicolle et al. 2006).

No Brasil, o primeiro relato foi feito por Travassos em 1927, que recuperou do ventrículo direito e da artéria pulmonar exemplares do nematoide, que o autor identificou como *Haemostrogylus raillet* (= *A. vasorum*), em cachorros do mato

(*Cerdocyon thous azarae*) provenientes do município do Rio de Janeiro – RJ. Gonçalves, em 1961, observou cães domésticos naturalmente infectados por *A. vasorum* no Rio Grande do Sul. Langenegger et al. (1962) registraram a ocorrência do parasito em dois cães naturalmente infectados, provenientes do município do Rio de Janeiro. Posteriormente, foram relatados casos em Salvador (Fehringer & Fiedler 1977) e no estado do Paraná (Giovanonni et al. 1985). Em 1985, Lima et al. recuperaram larvas L1 das fezes de dois cães adultos naturalmente infectados provenientes do município de Caratinga – Minas Gerais. Na necropsia foram recuperados espécimes adultos de *A. vasorum* das artérias pulmonares e ramificações dos dois cães. Esse foi o primeiro relato do parasito no estado de Minas Gerais. Em 1994, Lima et al. relataram a infecção natural por *A. vasorum* em quatro raposas do campo (*Dusicyon vetulus*) provenientes do sul do estado de Minas Gerais, mantidas no zoológico de Belo Horizonte. A infectividade das larvas encontradas foi testada pela infecção em moluscos *Biomphalaria glabrata* e posteriormente em cães. Em 2007, Duarte et al. relatam a primeira infecção natural de *A. vasorum* em *Cerdocyon thous* no estado de Minas Gerais.

## **2 - Taxonomia**

Na classificação taxonômica a espécie *A. vasorum*, segundo Costa et al. (2003), pertence à Classe Nematoda, Ordem Strongylida, Família Protostrongylidae, Subfamília Angiostrongylinae, Gênero *Angiostrongylus*, Espécie *Angiostrongylus vasorum*.

## **3 - Morfologia de *A. vasorum***

Morfologicamente, a espécie é caracterizada por apresentar o corpo delgado e alongado, ligeiramente atenuado nas extremidades, coloração esbranquiçada ou rósea quando recém colhidos. A cutícula é fina e transparente, podendo-se perceber o aspecto helicoidal dos órgãos genitais em torno do tubo digestivo, contrastando sua coloração esbranquiçada com a tonalidade rósea ou acinzentada do intestino. Apresenta uma ligeira dilatação na cutícula da extremidade cefálica, a abertura bucal é pequena, arredondada e tem comunicação direta com o esôfago, que é claviforme e ligeiramente mais alargado na porção final. O poro excretor situa-se ventralmente abaixo da união do esôfago e intestino.

Os machos apresentam tamanho médio de 13 mm de comprimento e de 0,24 mm de largura e a extremidade posterior levemente recurvada ventralmente, com presença de bolsa copuladora e raios bursais evidentes. Os espículos são longos, fortes e subiguais com estriações transversais (Guilhon & Cens 1973, Lima et al. 1985).

As fêmeas são maiores e mais robustas, com média de 17 mm de comprimento e de 0,26 mm de largura, a vulva fica anterior ao ânus, a cauda é curta e apresenta uma expansão cuticular em forma de bainha que se projeta além da cauda.

A larva de primeiro estágio (L1), mede cerca de 264,4 µm de comprimento e 11,2 µm de largura, se caracteriza por ser fina e transparente, com a extremidade anterior arredondada e a cauda recurvada ventralmente com apêndice unguiforme. A larva de segundo estágio (L2), mede cerca de 338,09 µm de comprimento e 12,78 µm de largura, é pouco móvel, ficam dispostas em arco e apresentam cor amarronzada, devido à presença de grânulos dentro das células intestinais, apresentam duas bainhas que ocupam todo o espaço em seu interior. Já a larva de terceiro estágio (L3), mede cerca de 362,12 µm de comprimento e 19,10 µm de largura, aparece livre das bainhas, sendo mais claras e transparentes, com a presença de dois bastões quitinosos dispostos longitudinalmente na extremidade anterior, sua cauda termina com apêndice digitiforme (Guilhon & Cens 1973, Lima et al. 1985, Bessa et al. 2000, Costa et al. 2003, Mozzer 2010).

#### **4 - Hospedeiros intermediários de *A. vasorum***

Os hospedeiros intermediários de *A. vasorum* são moluscos aquáticos e terrestres. Diversas espécies de moluscos foram infectados experimentalmente, para analisar a sua susceptibilidade como hospedeiro intermediário, tais como o *Arion. Rufus* (Guilhon 1965), *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Cepaea nemoralis*, *Arianta arbustorum*, *Euparypha pisana*, *Succinea putris*, *Cochlodina laminata*, (Guilhon & Afghahi 1969), *Biomphalaria glabrata* (Guilhon & Afghahi 1969, Barçante et al. 2003), *Biomphalaria tenagophila* (Pereira et al. 2006), *Laevicaulis alte*, *Bradybaena similaris*, *Subulina octona*, *Prosopaeas javanicum* (Rosen et al. 1970), *Achatina fulica* (Sauerlander & Eckert 1974, Coaglio 2013), *Omalonyx matheroni* (Mozzer et al. 2011), *Melanooides tuberculata*, *Bradybaena similaris* e *Sarasinula marginata* (Paula-Andrade 2012).

## 5 - Hospedeiros definitivos de *A. vasorum*:

Os hospedeiros definitivos de *A. vasorum* são canídeos silvestres e domésticos, principalmente. Além de *Canis familiares*, outras espécies de mamíferos já foram descritos como hospedeiros definitivos, conforme mostra a tabela 1.

ANIMAL	ESPÉCIE	TIPO DE INFECÇÃO	LOCAL DESCRITO	REFERÊNCIA
Raposa	<i>Vulpes vulpes</i>	Natural	Suíça Reino Unido Península Ibérica Grã Bretanha Canadá Dinamarca Portugal Reino Unido Escócia	Eckert e Lammler 1972 Simpson 1996 Gerrikagoitia, et al.2010 Morgan et al. 2008 Jefferies et al. 2010 Al-Sabi et al. 2010 Jefferies et al. 2010 Jefferies et al. 2010 Philbey, 2013
Raposa do campo	<i>Dusicyon vetulus</i>	Natural	Brasil	Lima et al. 1994
Cachorro do mato	<i>Cerdocyon thous</i>	Natural	Brasil	Travassos, 1927 Duarte et al. 2007
Lobo	<i>Canis lupus</i>	Natural	Espanha	Segovia et al. 2001
Coioote	<i>Canis latrans</i>	Natural	Canadá	Bourque et al. 2005, Bridger et al. 2009 Jefferies et al. 2010
Chacal	<i>Canis aureus</i>	Experimental	Europa	Bolt et al. 1994
Lontra	<i>Lutra lutra</i>	Natural	Dinamarca	Madsen et al. 1999
Arminho	<i>Mustela erminea</i>	Natural	Reino Unido	Simpson, 2010
Panda Vermelho	<i>Ailurus fulgens</i>	Natural	Reino Unido Zoológico Europa	Patterson-Kane et al. 2009 Bertelsen et al. 2010
Irara	<i>Tayra barbara senex</i>	Natural	América	Yamaguti, 1961
Rato do Nilo	<i>Arvicanthis niloticus</i>	Experimental	Alemanha	Eckert e Lammler 1972
Gato doméstico	<i>Felis catus domesticus</i>	Experimental	Brasil	Dias, 2006
Texugo	<i>Meles meles</i>	Natural	Espanha	Torres et al, 2001

Tabela 1: Hospedeiros definitivos descritos para *Angiostrongylus vasorum*

## 6 - Ciclo biológico de *A. vasorum*

O ciclo de vida de *A. vasorum* é heteroxeno com gastrópodes servindo como hospedeiros intermediários e canídeos como principais hospedeiros definitivos. As larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo e, no ambiente, estas podem permanecer no bolo fecal ou atingir coleções de água. Moluscos terrestres ou aquáticos infectam-se pela ingestão ou pela penetração ativa das L1 através do tegumento. Nos tecidos do molusco, a L1 sofre duas mudas e

origina larva de segundo estágio (L2) e larva de terceiro estágio (L3), que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre pela ingestão da L3. Embora os cães não tenham o hábito de se alimentarem de moluscos, a ingestão pode ocorrer de forma acidental, uma vez que as L3 podem ser liberadas pelo molusco e atingir a água ou alimentos. A ingestão de hospedeiros paratênicos, tais como roedores (Dias et al. 2004) e rãs (*Rana temporaria*) que foram infectadas experimentalmente por *A. vasorum*, apresentando potencial para serem inseridas no ciclo biológico deste parasito (Bolt et al. 1993). Após a ingestão das larvas infectantes, estas penetram na parede do trato digestivo e migram até os linfonodos mesentéricos onde, por volta do terceiro dia de infecção, ocorre a muda de L3 para larva de quarto estágio (L4) e adulto imaturo. Estes alcançam a corrente sanguínea e aproximadamente no décimo dia de infecção, podem ser encontrados no ventrículo e nas artérias pulmonares. Por volta do trigésimo dia de infecção os helmintos atingem a maturidade sexual nas artérias pulmonares, onde ocorre a cópula e início da postura de ovos não embrionados pelas fêmeas. Nas arteríolas pulmonares ocorre o embrionamento dos ovos e desenvolvimento das larvas de primeiro estágio (L1) que eclodem passando ativamente para os alvéolos, bronquíolos e brônquios e podem ser expelidas junto a secreções pulmonares ou então serem deglutidas e eliminadas juntamente com as fezes. (Bwangamoi 1974, Mahaffey 1981, Patterson et al. 1993). O período pré-patente varia entre 28 e 108 dias. (Guilhon & Cens 1969, Barçante 2004, Helm et al. 2010, Mozzer et al. 2011, Dracz et al. 2014).

## **7 - Patologia:**

As larvas de primeiro estágio migram para os espaços aéreos e causam hemorragias pulmonares, enfisema e inflamação granulomatosa focal. Granulomas geralmente desenvolvem como respostas aos ovos e as larvas (Mahaffey et al 1981, Prestwood et al 1981).

Os parasitos imaturos e adultos alcançam a artéria pulmonar e ventrículo direito do coração causando trombose (Rosen et al. 1970). O processo inflamatório, eventualmente, se estende até o tecido circundante das artérias pulmonares que leva a focos de pneumonia intersticial. Com o avanço da doença, podem-se observar uma aderência entre os pulmões, pericárdio e mediastino como consequência da inflamação e

lesões locais. Outras alterações patológicas pulmonares comuns são a consolidação, fibrose e coagulopatia (Bourque et al 2002, Nicolle et al 2006).

Os linfonodos mediastinos, bronquiais e submandibulares podem-se apresentar intumescidos e hemorrágicos, caracterizando uma linfadenite generalizada (Prestwood et al. 1981). Na infecção crônica há fibrose pulmonar, resultando em hipertensão pulmonar que pode levar a insuficiência cardíaca congestiva direita. Em alguns casos, podem ocorrer distúrbios hemorrágicos devido à coagulação intravascular disseminada ou trombocitopenia imunomediada. Sangramento prolongado, baixa contagem de plaquetas, hemoptise, coagulação intravascular, anemia e hematomas subcutâneos têm sido relatados em cães infectados naturalmente ou experimentalmente (Schelling et al 1986, Caruso & Prestwood 1988, Ramsey et al 1996, Gould & McInnes 1999, Singleton 1994, Cury et al 2002, Chapman et al. 2004).

Há relatos de cães com hemorragias intracranianas e escleral (Garosi et al. 2005), hemorragias no cérebro e medula espinhal (Wessmann et al. 2006) devido a distúrbios de coagulação e a deficiência de fator de von Willebrand que acompanham distúrbios hemorrágicos graves, que podem levar à morte (Whitley et al. 2005).

A migração errática do parasito também vem sendo registrada na literatura. Resultados de diversos autores mostraram que não existe um comportamento ortodoxo de migração das larvas deste parasito. Assim, as localizações erráticas constituem um fato importante na patogenia da infecção pelo *A. vasorum*, pois, as larvas e adultos podem morrer e produzir lesões extensas e graves a ponto de subverter a arquitetura do órgão no qual estão localizadas (Rosen et al. 1970, Bhaibulaya 1975, Perry et al. 1991, Costa 1992, Cury & Lima 1995, Costa & Tafuri 1997, Oliveira-Júnior et al. 2005, Mozzer & Lima 2012).

## **8 - Sinais Clínicos:**

Os canídeos podem permanecer assintomáticos por anos após a infecção por *A. vasorum* (Ramsey et al. 1996). Os principais sinais clínicos têm sido associados com doença pulmonar crônica e insuficiência cardíaca e alguns casos de sinais neurológicos, doença ocular e morte súbita (Martin 1989, Perry et al. 1991, Bolt et al. 1994, King et al. 1994, Wessmann et al. 2006, Mozzer & Lima 2012 ).

Cães infectados com *A. vasorum* apresentam sinais clínicos que incluem apatia, anorexia, náusea, tosse, perda de peso, vômito, ascite, diminuição da tolerância a atividade física, dor abdominal e dispnéia intensa (Koch et al. 1992, Martin et al. 1993, Cury & Lima 1996, Ramsey et al. 1996, Costa & Tafuri 1997, Cury et al. 2002, Brennan et al. 2004). Os sinais neurológicos incluem ataxia, problemas de visão, convulsões, dor na medula espinhal e paresia (Perry et al. 1991, Wessmann et al. 2006).

## **9 – Diagnóstico:**

Para o diagnóstico da angiostrongilose canina, o encontro de larvas de primeiro estágio nas fezes é primordial para um diagnóstico específico (Conboy 2000, Willesen et al. 2008, Negrin et al. 2008, van Doorn et al. 2009). O método de Baermann é o método clássico usado para a demonstração de larvas do parasito nas fezes de cães infectados. O diagnóstico *post mortem* pode ser realizado, onde parasitos adultos, ovos e larvas podem ser encontrados principalmente no coração e pulmões (Costa 1992, Brennan et al. 2004, Traversa et al. 2008, Eleni et al. 2013) e em análise histopatológica revela a presença de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e focos de reação granulomatosa com células gigantes multinucleadas, essas respostas são devido a resposta inflamatória dos ovos e a migração das larvas (Elsheikha et al. 2014, Rinaldi et al. 2014).

O diagnóstico clínico pode ser feito com base nos resultados dos testes laboratoriais conjuntamente com sinais clínicos. Entretanto, um diagnóstico definitivo da doença requer a demonstração do parasito. A maior dificuldade, no diagnóstico, porém, deve-se ao fato de os sinais clínicos da doença não serem específicos e podem ser confundidos com outras enfermidades, para isso é necessário exames que detectam o DNA ou anticorpo anti-*A. vasorum* do parasito.

O teste “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) foi utilizado pela primeira vez por Cury et al. (1996) como um método de diagnóstico da angiostrongilose canina detectando anticorpos reativos para *A. vasorum*. Segundo os autores, há presença de altos níveis de anticorpos IgG circulantes em cães experimentalmente infectados a partir do 14º dia após a infecção decorrente da síntese de antígenos durante a migração e mudas das larvas e a grande atividade metabólica dos parasitos. Porém, este teste também foi capaz de detectar anticorpos não específicos, caracterizando a ocorrência de reação cruzada com antígenos de outros helmintos. Com relação à técnica de

Immunoblotting, Cury et al. (2002), analisaram o comportamento do anticorpo IgG presente nos soros de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* utilizando antígeno somático de parasitos adultos. Observou um forte reconhecimento das proteínas de peso molecular estimados em 115 e 102 KDa, indicando-as como as principais proteínas na infecção por *A. vasorum*.

Para detectar *A. vasorum* tem sido utilizado em cães a Reação de cadeia Polimerase (PCR) para identificar o DNA parasitário em cão infectado (Helm et al. 2009) em seu estudo foi confirmado a presença deste parasito em um cão que estava com hemorragia escleral. A análise com PCR permite a confirmação do diagnóstico, a prevalência do parasito em estudos epidemiológicos (Al-Sabi et al. 2010, Miterpáková et al. 2014)

Nos animais com suspeita clínica os exames ecocardiográficos, eletrocardiográficos e radiológicos podem ser utilizados como metodologias de auxílio para o diagnóstico diferencial e como forma de acompanhamento das alterações promovidas pelo parasitismo (Cury 1999, Cury et al. 2001). Em estudos radiológicos os cães naturalmente e experimentalmente infectados apresentaram as primeiras alterações entre cinco e sete semanas após a infecção e o achado mais comum foi o espessamento brônquico (Patteson et al. 1993, Ramsey et al. 1996, Conboy 2000, Boag et al. 2004).

## JUSTIFICATIVA

*Angiostrongylus vasorum* é um parasito de distribuição cosmopolita. Entretanto, existe uma maior frequência de casos de angiostrongilose canina em países de clima temperado o que abre lacunas dentro da epidemiologia desta doença e levanta dúvidas tais quais: a temperatura ou incidência solar afetaria de alguma forma a biologia do parasito? Existiria outros hospedeiros dentro do ciclo do parasito que poderiam facilitar a dispersão do mesmo?

Sabe-se que a infecção do hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de L3 de *A. vasorum*. Essa infecção pode ocorrer pela ingestão do molusco contendo L3 ou a própria L3 pode sair ativamente do tegumento levando à contaminação de água e alimentos. A presença de novos hospedeiros paratênicos esclareceria melhor a epidemiologia da doença na natureza uma vez que moluscos não fazem parte da principal fonte alimentar dos carnívoros.

Os animais parasitados apresentam sinais clínicos diversos incluindo problemas respiratórios, distúrbios de coagulação, envolvimento neurológico e morte. Dentre os relatos de casos de infecção natural todos reportam a animais em fase adulta. Não existem estudos envolvendo a transferência de anticorpos anti- *Angiostrongylus vasorum* maternos aos filhotes e se estes conferem proteção à doença, sendo uma das lacunas no processo de parasitismo e permanência do hospedeiro na população canina.

Por todos estes fatores citados, o presente trabalho se propõe a esclarecer estes questionamentos sobre a biologia e epidemiologia do parasito.

## OBJETIVOS

- Avaliar a sobrevivência de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* no bolo fecal no meio ambiente e em temperaturas de 4°C e -20°C.
- Avaliar a susceptibilidade e o comportamento de *Pomacea canaliculata* à infecção por *A. vasorum*.
- Avaliar *Gallus gallus domesticus* como hospedeiro paratênico de *A. vasorum*.
- Avaliar a existência de transferência passiva de anticorpos anti-*Angiostrongylus vasorum* de cadelas com angiostrongilose para seus filhotes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Acedo CS, Diez JB, Morales JG 1979. Angiostrongylosis canina. *Ver. Iber. Parasitol.* 39: 135-142.
- Alicata JE 1988. *Angiostrongylus cantonensis* (eosinophilic meningitis): historical event in its recognition as a new parasitic disease of man. *J. Washington Acad. Sci. Parasitol.* 39: 135-14.
- Al-Sabi MN, Deplazes P, Webster P, Willesen JL, Davidson RK, Kapel CM 2010. PCR detection of *Angiostrongylus vasorum* in faecal samples of dogs and foxes. *Parasitol Res.* 107:135-40.
- Al-Sabi MN, Kapel CM, Johansson A, Espersen MC, Koch J, Willesen JL 2013. A coprological investigation of gastrointestinal and cardiopulmonary parasites in hunting dogs in Denmark. *Veterinary Parasitology* 196: 366-372.
- Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, Vieira LQ, Lima WS, Negrão- Corrêa D 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res* 89:89-93.
- Barçante TA, Barçante JM, Dias SR, Lima WS 2003. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitol Res.* 91:471-475.
- Barçante JMP 2004. *Aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos de cães experimentalmente infectados por Angiostrongylus vasorum*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 176pp.
- Barreto CS, Prestes NC 2004. Imunidade e nutrição neonatal canina. *Rev Cient Med Vet.* 2(5):57-60.
- Barutzki D, Schaper R 2003. Endoparasites of dogs and cats in Germany (1999-2002). *Parasitology Research* 90:148-150.

Bessa ECA, Lima WS, Daemon E, Cury MC, Araújo JLB 2000. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensnky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (Molusca, Subulinidae) em condições de laboratório. *Rev. Bras. Zool.* 17:29-41.

Bhaibulaya MA 1975. Comparative studies on the life history of *Angiostrongylus mackerrasae*, Bhaibulaya, 1968 and *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). *Int. J. Parasitol.* 7: 7-20.

Boag AK, Lamb CR, Chapman PS, Boswood A 2004. Radiographic findings in 16 dogs infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Vet Rec* 154:426–430.

Bolt G, Monrad J, Frandsen F, Henriksen P, Dietz HH 1993. The common frog (*Rana temporaria*) as a potencial paratecnic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol. Res.* 79: 428-430.

Bolt G, Monrad J, Koch J, Jensen AL 1994. Canine angiostrongylosis: a review. *Vet. Rec.* 135: 447-452.

Bourque A, Conboy G, Miller L, Whitney H, Ralhan S 2002. *Angiostrongylus vasorum* infection in 2 dogs from Newfoundland. *Can Vet J.* 43(11):876-9.

Bourque A, Whitney H, Conboy G 2005. *Angiostrongylus vasorum* infection in a coyote (*Canis latrans*) from Newfoundland and Labrador, Canada. *J Wildl Dis.* 41:816-9.

Brennan SF, Mccarthy G, Mcallister H, Basset H, Jones BR 2004. Clinical signs, diagnosis and treatment of three dogs with angiostrongylosis in Ireland. *Irish Vet. J.* 57: 103-109.

Bridger KE, Baggs EM, Finney-Crawley J 2009. Endoparasites of the coyote (*Canis latrans*), a recent migrant to insular newfoundland. *Journal of wildlife diseases* 45: 1221-6.

Bwangamoi O 1972. *Angiostrongylus vasorum* and other worms in dogs in Uganda. *Vet. Rec.* 19: 267.

Bwangamoi O 1974. Renal lymphoid and pulmonary lesions in naturally acquired canine angiostrongylosis in Uganda. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* 22: 55-68.

Caruso JP, Prestwood AK 1998. Immunopathogenesis of canine Angiostrongylosis: Pulmonary effects of Infection. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 85-92.

Coaglio ASL 2013. Susceptibilidade e comportamento de *Achatina fulica* infectada com *Angiostrongylus vasorum*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 70 pp.

Conboy GA 2000. Canine Angiostrongylosis (French Heartworm). In: Bowmann DD 2000. Companion and Exotic Animal Parasitology. Ithaca NY: *International Veterinary Information Service*.

Costa JO 1992. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: considerações taxonômicas, patológicas e de diagnóstico imunológico (ELISA) em cães experimentalmente infectados. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 135pp.

Costa JO, Taffuri WL 1997. Estudo anátomo-patológico de cães infectados experimentalmente pelo *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.* 49: 389-407.

Cury MC, Lima WS, Vitor RWA 1996. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) infection in dogs. *Revue Méd. Vét.* 147: 525-530.

Cury MC, Lima WS 1996. Rupture of femoral artery in a dog infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Vet Parasitol.* 65(3-4):313-5.

Cury MC, Lima WS 1996. Aspectos clínicos de cães infectados experimentalmente com *Angiostrongylus vasorum*. *Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec.* 48: 27-34.

Cury MC 1999. Avaliação das alterações sanguíneas, hepáticas, renais, pulmonares e cardíacas em cães inoculados experimentalmente com *Angiostrongylus vasorum* (Baillet 1866) Kamensky, 1905. Tese de doutorado, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 206 pp.

Cury MC, Lima WS, Guimarães MP, Muzzi RAL, Bregunci GC 2001. Radiology, Eletrocardiography and Echocardiography for the diagnosis of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) infection in dogs. *Rev. Med. Vet.* 152:153-156.

Cury MC, Guimarães MP, Lima WL, Vitor RWA 2002. Western blot analysis of the humoral response of dogs experimental infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Vet. Parasitol.* 106:83-87.

Cury MC, Lima WS, Guimarães MP, Carvalho MG 2002. Hematological and coagulation profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Vet. Parasitol* 104: 139–149.

Chapman PS 2006. Clinical Aspects of Angiostrongylosis in Dogs. 16th ECVIM-CA congress proceedings. September 14-16, Amsterdam.

Chapman PS, Boag AK, Guitian J, Boswood A 2004. *Angiostrongylus vasorum* infection in 23 dogs (1999-2002). *J Small Anim Pract* 45(9):435-40.

Conboy GA 2000. Canine Angiostrongylosis (French Heartworm). In: Bowmann, D.D. *Companion and Exotic Animal Parasitology*.

Dias SRC 2006. Susceptibilidade do gato doméstico (*Felis catus*) à infecção por *Angiostrongylus vasorum*: parâmetros clínicos, parasitológicos e laboratoriais. Tese de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 101pp.

Di Cesare A, Castagna G, Meloni S, Milillo P, Latrofa S, Otranto D, Traversa D 2011. Canine and feline infections by cardiopulmonary nematodes in central and southern Italy. *Parasitol Res* 109 Suppl 1:S87-96.

Duarte FH, Vieira FM, Louzada GL, Bessa ECA, Souza LS 2007. Occurrence *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) (Nematoda, Angiostrongylidae) in *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 (Carnivora, Canidae) in Minas Gerais State Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59: 1086-1088.

Dodd K 1973. *Angiostrongylus* (Baillet, 1866) Infestation in a Greyhound Kennels. *Vet. Rec.* 24: 195-197.

Dracz RM 2012. Interação entre *Angiostrongylus vasorum* e *Ancylostoma caninum*: aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos em cães experimentalmente infectados. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 102pp.

Eckert J, Lämmler G 1972. Angiostrongylose bei Mensch und Tier. 1972. *Z. Parasitenk.* 39:303-322.

Eleni C, De Liberato C, Azam D, Morgan ER, Traversa D. 2013. *Angiostrongylus vasorum* in wolves in Italy. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 3(1):12-4.

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

Fehringer WT, Fiedler HH 1977. Dois novos casos de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) do cão (*Canis familiaris*) em Salvador. *Arq. Esc. Med. Vet. Salvador* 2: 110-114.

Gallagher B, Brennan SF, Zarelli M, Mooney CT. 2012. Geographical, clinical, clinicopathological and radiographic features of canine angiostrongylosis in Irish dogs: a retrospective study. *Ir Vet J.* 65(1):5.

Gerrikagoitia X, Barral M, Juste RA 2010. *Angiostrongylus* species in wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Vet Parasitol.* 174:175-80.

Giovanonni M, Fernandez BF, Kavinsky LC 1985. Angiostrongilose do cão. *Arq. Biol. Tec. Paraná* 28: 601-604.

Gould SM, McLnnes EL1999. Immune-mediated thrombocytopenia associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 40: 227-232.

Guardone L, Schnyder M, Macchioni F, Deplazes P, Magi M 2013. Serological detection of circulating *Angiostrongylus vasorum* antigen and specific antibodies in dogs from central and northern Italy. *Vet Parasitol.*192(1-3):192-8.

Guilhon J 1965. Evolution larvaire d'*Angiostrongylus vasorum* (Baillet,1866) dans l'organisme d'Arionidés. *Comptes rendus Acad. Sci, Série D* 261:4225-4227.

Guilhon J, Afghahi A 1969. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet 1866) in organisms of various species of terrestrial molluscs. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Série D, Sciences naturelles* 268:434-436.

Guilhon J, Cens B 1973. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Etude biologique et morphologique. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 48: 567-596.

Helm J, Gilleard JS, Jackson M, Redman E, Bell R 2009. A case of canine *Angiostrongylus vasorum* in Scotland confirmed by PCR and sequence analysis. *J Small Anim Pract.* 50(5):255-9.

Helm JR, Morgan ER, Jackson MW, Wotton P, Bell R 2010. Canine angiostrongylosis: an emerging disease in Europe. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 20: 98-109.

Hurníková Z, Miterpáková M, Mandelík R. 2013. First autochthonous case of canine *Angiostrongylus vasorum* in Slovakia. *Parasitol Res.* 112(10):3505-8.

Incani RN, Caldeiras E, Martín M, Gongonzález C 2007. Human infection by *Angiostrongylus costaricensis* in Venezuela: First report of a confirmed case. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 49: 197-200.

Jefferies R, Shaw SE, Willesen J, Viney ME, Morgan ER 2010. Elucidating the spread of the emerging canid nematode *Angiostrongylus vasorum* between Palaearctic and Nearctic ecozones. *Infect Genet Evol.* 10:561-8.

Jessen LR, Wiinberg B, Kjelgaard-Hansen M, Jensen AL, Rozanski E, Kristensen AT. 2010. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activity in healthy and diseased dogs. *Vet Clin Pathol.* 39(3):296-301.

King MCA, Grose RMR, Startup G 1994. *Angiostrongylus vasorum* in the anterior chamber of a dog's eye. *J. Small Anim. Pract.* 35: 326-328.

Koch J, Jensen AL, Monrad L 1992. *Angiostrongylus vasorum* infected in a Scottish terrier associated with gastric dilation. *J. Small Anim. Pract.* 33: 239-241.

Langenegger J, Langenegger AM, Dacorso Filho P, Gouvea GLA 1962. Ocorrência da infestação por *Angiostrongylus vasorum* em cães do Rio de Janeiro. In: *Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária* 7: 246-247.

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

Lima WS, Araujo Costa HM, Guimarães MP, Leite A 1985. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80: 233-235.

Lima WS, Guimaraes MP, Lemos IS 1994. Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. *J. Helminthol* 68: 87.

Mahaffey MB, Losonky JM, Prestowook AK, Mahaffey EA, Lewis RE 1981. Experimental canine Angiostrongylosis: II. Radiographic manifestation. *J. Am. Anim. Hos. Assoc.* 17: 499-502.

Majoros G, Fukár O, Farkas R 2010. Autochthonous infection of dogs and slugs with *Angiostrongylus vasorum* in Hungary. *Vet Parasitol.* 174(3-4):351-4.

Martin M 1989. Heartworm infection death in a young dog. *Vet Rec.* 124(17):470.

Martin MWS, Ashton G, Simpson BR 1993. Angiostrongylosis in Cornwall: clinical presentations of eight cases. *Journal of Small Animal Practice* 17: 20-25.

Miterpáková M, Hurníková Z, Zalewski AP 2014. The first clinically manifested case of angiostrongylosis in a dog in Slovakia. *Acta Parasitol.* 59(4):661-5.

Mozzer LR 2010. Desenvolvimento dos estádios evolutivos de *Angiostrongylus vasorum* em moluscos do gênero *Omalonyx* e aspectos clínicos da angiostrongilose em *Canis familiaris*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 98 pp.

Mozzer LR, Lima WS 2012. Rupture of the thoracic aorta associated with experimental *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog. *Parasite* 19:189-191.

Mozzer LR, Montresor LC, Vidigal TH, Lima WS 2011. *Angiostrongylus vasorum*: Experimental Infection and Larval Development in *Omalonyx matheroni*. *Journal of Parasitology Research.* 2011: 1-4.

Negrin A, Cherubini GB, Steeves E 2008. *Angiostrongylus vasorum* causing meningitis and detection of parasite larvae in the cerebrospinal fluid of a pug dog. *J Small Anim Pract.* 49(9):468-71.

Nicolle AP, Chetboul V, Tessier-Vetzel D, Carlos Sampedrano C, Aletti E, Pouchelon JL 2006. Severe pulmonary arterial hypertension due to *Angiostrongylosus vasorum* in a dog. *Can Vet J.* 47(8):792-5.

Oliveira-Junior SD, Barçante JMP, Barçante TA, Ribeiro VM, Lima WS 2005. Ectopic location of adult worms and fist-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum* in an infected dogs. *Vet. Parasitol.* 121: 293-296.

Patteson MW, Gibbs C, Wotton PR, Day MJ 1993. *Angiostrongylus vasorum* infection in seven dogs. *Vet. Rec.* 133:565-570.

Patterson-Kane JC, Gibbons LM, Jefferies R, Morgan ER, Wenzlow N, Redrobe SP 2009. Pneumonia from *Angiostrongylus vasorum* infection in a red panda (*Ailurus fulgens fulgens*). *J Vet Diagn Invest.* 21:270-3.

Paula-Andrade C 2012. *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda: Protostrongylidae): Aspectos do desenvolvimento dos estádios evolutivos em *Melanoides tuberculata* (Caenogastropoda: Thiariidae), *Bradybaena similaris* (Stylommatophora: Xanthonychidae) e *Sarasinula marginata* (Soleolifera: Veronicellidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 104 pp.

Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Coelho PM, Lima WS, Negrão-Corrêa D 2006. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 98: 224-233.

Perry AW, Hertling R, Kennedy MJ 1991. Angiostrongylosis with disseminated larval infection associated with signs of ocular and nervous disease in an imported dog. *Can. Vet. J.* 32: 430-431.

Poli A, Arispici M, Marconcini A, Mancianti F, Monte D 1984. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in red foxes (*Vulpes vulpes* L.) in Italy. *J Wildl Dis.* 20: 345-6.

Prestwood AK, Greene CE, Mahhaffey EA, Burges DE 1981. Experimental canine angiostrongylosis: pathologic manifestations. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 17:491-497.

Ramsey PM, Littlewood JD, Dunn JK, Herrtage ME 1996. Role of chronic disseminated intravascular coagulation in a case of canine angiostrongylosis. *Vet. Rec.* 138: 360-363.

Rinaldi L, Cortese L, Meomartino L, Pagano TB, Pepe P, Cringoli G, Papparella S 2014. *Angiostrongylus vasorum*: epidemiological, clinical and histopathological insights. *BMC Vet Res.*10(1):236.

Rodriguez R, Dequi RM, Peruzzo L, Mesquita PM, Garcia E, Fornari F 2008. Abdominal angiostrongyliasis: report of two cases with different clinical presentations. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 50: 339-41.

Roberts FHS 1940. Notes on some helminthes infesting domestic animals in Queensland. *Austral. Vet. J.* 16: 30-33.

Rosen L, Ash LR, Wallace GD 1970. Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Am J Vet Res* 31: 131-143.

Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CMO 2006. Helminths of red Fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Vet. Parasitol.* 139: 168-179.

Sawanyawisuth K, Takahash K, Hoshuyama T, Sawanyawisuth K, Senthong V, Limpawattana P, Intapan PM, Wilson D, Tiamkao S, Jitpimolmard S, Chotmongkol V 2009. Clinical Factors Predictive of Encephalitis Caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81(4): 698–701.

Sauerländer R, Eckert J 1974. The African giant snail (*Achatina fulica*) as experimental intermediate host of *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda). *A Parasitenkd* 44: 59-72.

Schelling CG, Greene CE, Prestwood AK 1986. Coagulation abnormalities with acute *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs. *Am. Journal Vet. Res.* 7: 2669-2673.

Schnyder M, Tanner M, Webster P, Barutzki D, Deplazes P 2011. An ELISA for sensitive and specific detection of circulating antigen of *Angiostrongylus vasorum* in serum of naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 179:152–158.

Schnyder M, Schaper R, Bilbrough G, Morgan ER, Deplazes P. 2013. Seroepidemiological survey for canine angiostrongylosis in dogs from Germany and the UK using combined detection of *Angiostrongylus vasorum* antigen and specific antibodies. *Parasitology* 140(11):1442-50.

Schnyder M, Schaper R, Pantchev N, Kowalska D, Szwedko A, Deplazes P. 2013. Serological detection of circulating *Angiostrongylus vasorum* antigen- and parasite-specific antibodies in dogs from Poland. *Parasitol Res.* 112 Suppl 1:109-17.

Segovia JM, Torres J, Miguel J, Llaneza L, Feliu C 2001. Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. *J Helminthol.* 75: 183-192.

Simpson V. 2010. *Angiostrongylus vasorum* infection in a stoat. *Vet Rec.* 166(6):182.

Singleton P. 1994. Canine angiostrongylosis. *Vet Rec.* 135(22):536.

Souza JG, Simões RO, Thiengo SA, Lima WS, Mota EM, Rodrigues-Silva R, Lanfredi RM, Maldonado JrA 2009. A new metastrongilid species (Nematoda: Metastrongylidae): a lungworm from *Akodon montensis* (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil. *J Parasitol.* 95: 1507-11.

Tieri E, Pomilio F, Di Francesco G, Saletti MA, Totaro P, Troilo M, Menna S, Tampieri MP, Morelli D 2011. *Angiostrongylus vasorum* in 20 dogs in the province of Chieti, Italy. *Vet Ital.* 47(1):77-88, 65-76.

Traversa D, Torbidone A, Malatesta D, Guglielmini C 2008. Occurrence of fatal canine *Angiostrongylus vasorum* infection in Italy. *Vet Parasitol.* 152(1-2):162-6.

Traversa D, Di Cesare A, Meloni S, Frangipane di Regalbono A, Milillo P, Pampurini F, Venco L. 2013. Canine angiostrongylosis in Italy: occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in dogs with compatible clinical pictures. *Parasitol Res* 112(7):2473-80.

van Doorn DC, van de Sande AH, Nijse ER, Eysker M, Ploeger HW 2009. Autochthonous *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs in The Netherlands. *Vet Parasitol* 162(1-2):163-6.

Yamaguti S 1961. System Helminthum. Vol. III: The nematodes of vertebrates. Part I and II. Interscience Publishers.

Whitley NT, Corzo-Menendez N, Carmichael NG, McGarry JW 2005. Cerebral and conjunctival haemorrhages associated with von Willebrand factor deficiency and canine angiostrongylosis. *J Small Anim Pract.*46(2):75-8.

Willesen J, Bjornvad C, Koch J 2008. Acute haemoabdomen associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog: a case report. *Ir Vet J.* 61(9):591-3.

Willingham AL1, Ockens NW, Kapel CM, Monrad J. 1996. A helminthological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the metropolitan area of Copenhagen. *J Helminthol.*70(3):259-63.

## CAPÍTULO 1:

### SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁDIO DE *ANGIOSTRONGYLUS VASORUM* NO MEIO AMBIENTE

Lanuze Rose Mozzer; Aytube Lucas Coaglio; Walter dos Santos Lima.

#### RESUMO

*Angiostrongylus vasorum* parasita o coração e artérias pulmonares dos canídeos silvestres e domésticos. As larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas pelos hospedeiros definitivos juntamente com as fezes e estas infectam os moluscos terrestres e aquáticos, ocorrendo duas mudas em seu interior. Para avaliar a sobrevivência das L1 no ambiente utilizou-se 207 amostras de 50 g de pool de fezes de cães infectados com *A. vasorum* sobre papel impermeável do tipo celofane em locais sob incidência de luz solar, em locais sombreados, em geladeira (4°C) e em freezer (-20°C). Nas primeiras 12 horas o papel celofane de todas as amostras foi trocado de 2 em 2 horas para analisar se houve migração de larvas do bolo fecal. Nas 12 horas seguintes as amostras permaneceram no mesmo local sem trocas. Esse procedimento foi repetido no segundo dia de experimento. A partir de então, a troca do papel celofane e a retirada de amostras para análise ocorreu de 24 em 24 horas até o quinto dia do experimento. As amostras fecais que permaneceram a 4°C mantiveram as L1 vivas até o 5º dia do experimento (120 h). As amostras a -20°C, as L1 começaram a morrer com 36h e com 96h não havia larvas vivas. Nas fezes sob a incidência da luz solar observou-se a morte das larvas com 28h e após 48h todas as larvas estavam mortas. E nas fezes que permaneceram em área sombreada, as larvas começaram a morrer com 32h e chegou até o 5º dia do experimento com larvas vivas. Conclui-se que as L1 de *A. vasorum* suportam por maior período de tempo temperaturas mais baixas (4°C) em relação a temperatura ambiente (25°C) e a incidência solar direta sobre o bolo fecal estimula a migração das larvas e aumenta a mortalidade das mesmas.

## INTRODUÇÃO

*Angiostrongylus vasorum* parasita o coração, artérias pulmonares e suas ramificações dos canídeos silvestres e domésticos provocando alterações cardiorespiratórias que podem culminar em óbito do animal (Mozzer & Lima 2011). As larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas pelos hospedeiros definitivos juntamente com as fezes e estas são infectantes para os moluscos terrestres e aquáticos, aonde ocorre o desenvolvimento até a fase de terceiro estágio ou larva infectante para os canídeos.

Os fatores ambientais, como temperatura, umidade e precipitação, bem como a presença de hospedeiros intermediários e definitivos são importantes para a continuação do ciclo do *A. vasorum* (Taubert et al. 2009; Morgen et al. 2009; Ferdushy et al. 2009, 2010; Barutzki & Schaper 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* no bolo fecal sob incidência direta da luz solar, em áreas sombreadas, sob temperatura de 4°C e -20°C.

## MATERIAL E MÉTODOS

Fezes de 15 cães, infectados com *A. vasorum*, mantidos em baias individuais, foram coletadas às 8 horas da manhã. Estas foram homogeneizadas em uma vasilha plástica (50 x 30 cm) com auxílio de um bastão de madeira e, posteriormente, pesadas porções deste pool de fezes para formação de 69 amostras de 50 gramas. Em uma das amostras realizou-se o exame de fezes utilizando o aparelho de Baermann para quantificação das larvas de primeiro estágio (L1), seguindo a técnica de Barçante et al. (2003). O experimento foi repetido 3 vezes sendo analisado um total de 207 amostras.

Os bolos fecais de 50 gramas foram depositados em papel impermeável tipo celofane, cortados em quadrados de 40 cm para facilitar o manuseio das amostras e coloca-las nas condições padronizadas para o estudo. Amostras foram distribuídas em região de mata de preservação da Universidade Federal de Minas Gerais (cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, Brasil) da seguinte maneira: às 6 horas da manhã foram colocadas 17 amostras de fezes em local com incidência de luz solar e 17

amostras foram colocadas em local sombreado por árvores típicas do cerrado ao longo de todo o dia. Para mensurar a temperatura e a umidade ambiental foi colocado um termohigrômetro digital (Incoterm – Cotronic Technology Ltd/ Modelo 766302000). O restante das amostras foram distribuídas no mesmo horário e da seguinte maneira: 17 amostras foram colocadas em geladeira sob refrigeração (4°C) e 17 amostras foram colocadas no freezer (-20°C).

Durante as primeiras 12 horas do primeiro dia experimental, o papel celofane de todas as amostras foi trocado de 2 em 2 horas para analisar se houve migração de larvas do bolo fecal, no momento da troca foi anotado a temperatura e umidade ambiental. A migração de larvas foi considerada existente, quando estas foram encontradas em qualquer ponto do papel celofane fora do bolo fecal. Para isto toda a superfície do papel celofane foi dividida em quadrados de 5 cm (numerados para facilitar o posicionamento e conseqüentemente o cálculo da distância) e analisada em microscópio estereoscópio (20x). Foram realizadas demarcações no papel celofane na medida em que se encontravam as larvas. A distância entre a posição onde se encontrava o bolo fecal e as demarcações foi mensurada em centímetros. Para a troca do Papel celofane, o bolo fecal foi retirado cuidadosamente com uma pá de plástico e transferido para outro papel celofane e a amostra retornou ao mesmo local no qual se encontrava. A cada 2 horas uma amostra de cada situação foi retirada para realizar o exame de fezes pela técnica de Baermann, para contagem das larvas vivas presentes no bolo fecal. As amostras permaneceram em seus locais nas próximas 12 horas sem trocas. No segundo dia experimental, foram realizadas as trocas e medições seguindo a mesma rotina do primeiro dia. A partir do terceiro dia experimental, a troca do papel celofane e a retirada de amostras para análise das larvas ocorreu de 24 em 24 horas até o quinto dia (120 horas) de exposição das L1 no experimento.

As larvas recuperadas do bolo fecal durante o experimento foram utilizadas para infectar moluscos da espécie *Omalonyx matheroni* a fim de confirmar a viabilidade das larvas.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pelo pacote estatístico GraphPad Prism (versão 5.0) utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey, considerando um valor  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Nas amostras de fezes que estavam sob a incidência de luz solar as L1 presentes no bolo fecal começaram a morrer após 26 h, sendo que 72h após o início do experimento não foi recuperado L1 vivas nas fezes. Nas amostras que permaneceram em áreas sombreadas as L1 começaram a morrer após 30h e no quinto dia do experimento ainda se podia recuperar uma média de 65% de L1 vivas. Nas amostras de fezes que foram submetidas à baixa temperatura, observou-se que o bolo fecal exposto à refrigeração (4°C) não houve mortes de L1, estas permaneceram vivas durante os 5 dias do experimento. As amostras submetidas a -20°C, as L1 começaram a morrer após 34 h, com 72 horas de exposição uma média de 26% das larvas permaneciam vivas sendo que no quinto dia do experimento não foi recuperado L1 vivas (Tabela 1).

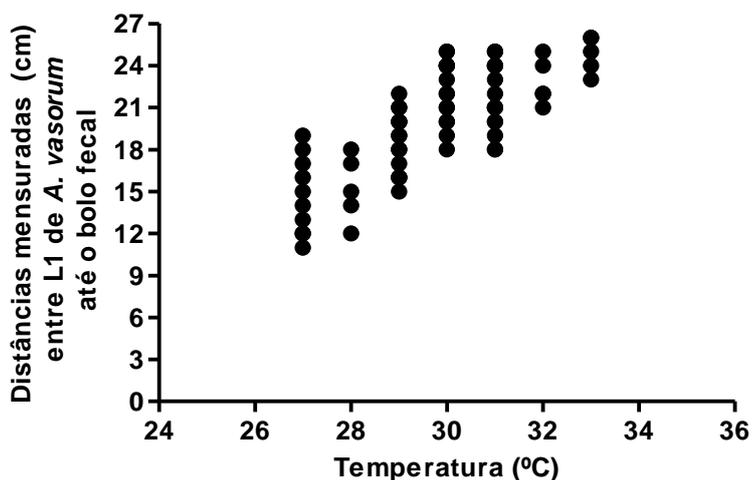
Tabela 1: Recuperação das larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* sob incidência direta de luz solar; local sombreado; geladeira (4°C) e freezer (-20°C).

Hora	Tempo de exposição no ambiente (horas)	Temperatura ambiente	Umidade	Percentual de larvas vivas dentro do bolo fecal			
				Incidência solar	Área sombreada	Geladeira 4°C	Freezer -20°C
8h	2	18, 21, 19	69, 67, 65	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
10h	4	20, 19, 22	68, 66, 65	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
12h	6	26, 25, 24	68, 67, 66	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
14h	8	30, 29, 26	67, 67, 65	100*, 100*, 100	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
16h	10	27, 26, 24	68, 67, 66	100*, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
18h	12	24, 24, 22	69, 68, 67	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
6 h	24	17, 19, 18	68, 68, 69	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
8h	26	19, 22, 20	69, 67, 66	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
10h	28	23, 24, 25	70, 69, 67	95; 95; 93	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
12h	30	27, 29, 29	68, 69, 70	82*; 80*; 81*	100, 100, 100	100, 100, 100	100, 100, 100
14h	32	31, 33, 31	69, 68, 67	75*; 73*; 72*	98, 97, 95	100, 100, 100	100, 100, 100
16h	34	28, 32, 31	69, 68, 69	73*, 71*; 70*	96, 95, 94	100, 100, 100	100, 100, 100
18h	36	26, 30, 30	70, 71, 70	74; 68*; 69*	96, 94, 93	100, 100, 100	91, 88, 90
6 h	48	19, 17, 18	68, 69, 68	51; 49; 47	97, 95, 93	100, 100, 100	77, 75, 74
6h	72	18, 20, 19	67, 68, 68	0, 0, 0	75, 73, 71	100, 100, 100	26, 24, 23
6h	96	18, 21, 20	69, 68, 68	0, 0, 0	72, 70, 68	100, 100, 100	12, 9, 10
6h	120	17, 19, 20	68, 69, 67	0, 0, 0	64, 66, 65	100, 100, 100	0, 0, 0

\* = presença de L1 de *Angiostrongylus vasorum* no papel celofane

A migração da L1 ocorreu quando o bolo fecal estava sob a incidência de luz solar e com a temperatura ambiente acima de 27°C (Tabela 1). As larvas encontradas fora do bolo fecal estavam sem motilidade e atingiram distâncias que variaram de 11 a 26 cm (Gráfico 1). Apesar das larvas encontradas em maior distância terem sido de amostras com temperatura maior que 29°C, não existe diferença estatística entre aumento de temperatura e maior distância de migração ( $p>0,05$ )

Gráfico 1: Avaliação da migração das larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* do bolo fecal sob influência da temperatura



As L1 recuperadas foram viáveis para infecção dos moluscos uma vez que houve recuperação de larvas de terceiro estágio de *A. vasorum*.

## DISCUSSÃO

O experimento demonstrou que as larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* sobreviveram a diferentes condições de temperatura, mostrando assim sua capacidade de se adaptar a diferenças climáticas, as L1 sobreviveram a temperaturas que variaram de -20°C a 30°C.

As larvas presentes no bolo fecal que permaneceram sob a incidência de luz solar sobreviveram até 48 h após o início do experimento, enquanto o bolo fecal

armazenado em área sombreada as larvas permaneceram vivas até o quinto dia do experimento. Ferdushy e Hasan (2010) observaram que as fezes que permaneciam em local sombreado (27°C) tiveram uma taxa de larvas vivas maior ao comparar com as larvas que ficaram em temperatura oscilando entre -5°C e 5°C. Este resultado é semelhante com o encontrado nesse trabalho, as larvas que permaneceram em local sombreado apresentaram uma taxa de 65% de L1 vivas após cinco dias. Entretanto, as larvas que permaneceram em temperatura constante de 4°C estavam todas vivas após 5 dias. Bourdeau (1993) relatou que as larvas de *A. vasorum* morreram rapidamente nas temperaturas entre 18°C e 25°C. Observamos que as fezes com *A. vasorum* que ficaram expostas a luz solar começaram a morrer após 28h, durante esse período foi observado a migração das larvas quando a temperatura estava acima de 27°C, o mesmo não ocorreu quando o bolo fecal permaneceu em áreas sombreadas sob a mesma temperatura ambiente, sugerindo que a incidência direta da luz solar estimula as L1 a saírem a fim de encontrar um local com sensação térmica mais amena. Ferdushy e Hasan (2010) analisaram as fezes de canídeos infectados com *A. vasorum* e observaram que a 5°C as larvas sobreviveram por até 80h e a 18°C elas sobrevivem por 42h. Neste estudo as larvas armazenadas a 4°C sobreviveram até o quinto dia (120 h), com a taxa de recuperação de 100% de L1 viva. O bolo fecal armazenado a -20°C chegou ao quinto dia do experimento sem larvas vivas.

Essa maior resistência das L1 a temperaturas mais baixas está em conformidade com o trabalho de Shostak e Samuel (1984) que ao estocarem as larvas dos metastrongilídeos *Parelaphostrongylus odocoilei* e *Parelaphostrongylus tenuis* a temperaturas que variaram entre 5°C a 36°C, observaram que as L1 deste parasito sobreviveram por 232 dias e 4 dias, respectivamente. As larvas armazenadas a 4°C e a temperatura ambiente foram capazes de se desenvolver na espécie de molusco *Omalonyx matheroni* até o estágio infectante, resultado semelhante foi observado no trabalho de Ferdushy et al. (2010) ao estocarem as larvas de *A. vasorum* a temperatura de 5, 10 e 15°C por 3 e 7 dias que independente da temperatura e do tempo de estocagem das larvas elas foram capazes de se desenvolver em *Arion lusitanicus* até o terceiro estágio, infectante para os canídeos. Sugerindo que as larvas de *A. vasorum* são capazes de sobreviverem a várias temperaturas e assim serem capazes de encontrar um hospedeiro intermediário para que possam se desenvolver e continuar o ciclo parasitário.

## CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que as larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* suportam por maior período de tempo temperaturas mais baixas (4°C) em relação a temperatura ambiente (25°C) e a incidência solar direta sobre o bolo fecal estimula a migração das larvas e aumenta a mortalidade das mesmas.

## REFERENCIAS

Barçante JM, Barçante TA, Dias SR, Vieira LQ, Lima WS, Negrão-Corrêa D 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first stage larvae from dog feces. *Parasitology Research* 89: 89-93.

Barutzki D, Schaper R 2009. Natural infections of *Angiostrongylus vasorum* and *Crenosoma vulpis* in dogs in Germany (2007–2009). *Parasitol Res* 105:39–48.

Stromberg BE 1998. Environmental factors influencing transmission. *Vet Parasitol* 72(3–4):247–264.

Ferdushy T, Kapel CMO, Webster P, Al-Sabi MNS, Grønvold JR 2009. The occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in terrestrial slugs from forests and parks in the Copenhagen area, Denmark. *J Helminthol* 83:379–383.

Ferdushy T, Kapel CMO, Webster P, Al-Sabi MNS, Grønvold JR 2010. The effect of temperature and host age on the infectivity and development of *Angiostrongylus vasorum* in the slug *Arion lusitanicus*. *Parasitol Res* 107:147–151.

Ferdushy T, Hasan MT 2010. Survival of first stage larvae (L1) of *Angiostrongylus vasorum* under various conditions of temperature and humidity. *Parasitol Res*. 107(6):1323-7.

Morgen ER, Jaffeires R, Krajewski M, Ward P, Shaw SE 2009. Canine pulmonary angiostrongylosis: the influence of climate on parasite distribution. *Parasitol Int* 58:406–410.

Mozzer LR, Montresor LC, Vidigal TH, Lima WS 2011. *Angiostrongylus vasorum*: Experimental Infection and Larval Development in *Omalonyx matheroni*. *Journal of Parasitology Research*. 2011: 1-4.

Shostak AW, Samuel WM 1984. Moisture and temperature effects on survival and infectivity of first-stage larvae of *Parelaphostrongylus odocoilei* and *P. tenuis* (Nematoda: Metastrongyloidea). *J Parasitol*. 70(2):261-9.

Taubert A, Pantchev N, Vrhovec MG, Bauer C, Hermosilla C 2009. Lungworm infections (*Angiostrongylus vasorum*, *Crenosoma vulpis*, *Aelurostrongylus abstrusus*) in dogs and cats in Germany and Denmark in 2003–2007. *Vet Parasitol* 159:175–180.

## CAPÍTULO 2:

### DESENVOLVIMENTO DE *ANGIOSTRONGYLUS VASORUM* (BAILLET, 1866) *POMACEA CANALICULATA* (LAMARCK, 1822).

Lanuze Rose Mozzer; Aytube Lucas Coaglio; Ruth Massote Dracz; Vinicius Marques Antunes Ribeiro; Walter dos Santos Lima.

#### RESUMO

*Angiostrongylus vasorum* é um nematóide parasito do coração, artéria pulmonar e seus ramos, principalmente de canídeos domésticos e silvestres. O ciclo biológico é heteroxeno tendo várias espécies de moluscos terrestres e aquáticos como hospedeiros intermediários, no entanto, a susceptibilidade é variável entre eles. *Pomacea canaliculata* é um molusco encontrado em lagos, pântanos e rios da América do Sul. Neste trabalho, foi avaliado a susceptibilidade, o crescimento, a oviposição e o desenvolvimento larvário em 282 *P. canaliculata* infectados com 500 larvas de primeiro estágio (L1) de *A. vasorum*. Diariamente, a partir do 5º dia após a infecção (dpi) até o 30º dpi, sete exemplares foram sacrificados para recuperação dos estádios larvais. Foram comparadas 50 desovas de moluscos infectados e não infectados quanto ao número de ovos por desova, a taxa de eclosão e o crescimento dos moluscos. A recuperação larvária variou de 38,2% a 65,9%, sendo que larvas de primeiro estágio (L1) foram encontradas até o 19º dpi, larvas de segundo estágio (L2) do 11º ao 25º dpi e larvas de terceiro estágio (L3) a partir do 19º dpi. Os moluscos infectados apresentaram maior número de ovos por desova. Entretanto, a taxa de eclosão e o tamanho da concha foram menores no grupo infectado em relação ao grupo controle. Este é o primeiro relato de infecção experimental de *P. canaliculata* por *A. vasorum*, confirmando a sua inespecificidade em relação ao hospedeiro intermediário e indicando a importância de levantamentos epidemiológicos direcionados ao parasito e este molusco.

## INTRODUÇÃO

*Angiostrongylus vasorum* é um nematóide que parasita o sistema cardiorrespiratório principalmente, de canídeos silvestres e domésticos (Guilhon & Cens 1969, Morgan et al. 2005, Helm et al. 2010, Mozzer et al. 2011). Apresenta ampla distribuição mundial, tendo sido relatado na Europa, América do Norte, América do Sul e África, atingindo regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Lima et al. 1985, Williams et al. 1985, Koch & Willeesen, 2009). O ciclo biológico é heteroxeno tendo várias espécies de moluscos terrestres e aquáticos como hospedeiros intermediários, que se infectam pela ingestão ou penetração de larvas de primeiro estágio (L1) presentes nas fezes de canídeos. Nos tecidos do invertebrado as larvas se desenvolvem em larvas de segundo estágio (L2) e terceiro estágio (L3) (Rosen et al. 1970, Mozzer et al. 2011).

Os canídeos se infectam após a ingestão de L3 presentes no molusco infectado ou em hospedeiros paratênicos (Bolt et al. 1993).

A L3 penetra na parede do trato digestivo do hospedeiro vertebrado, migrando até os linfonodos mesentéricos, onde ocorre a muda para larva de quarto estágio (L4) e adulto imaturo, que alcançam a corrente sanguínea e após cerca de 10 dias são encontrados no ventrículo direito e nas artérias pulmonares (Guilhon & Cens, 1969, Barçante, 2004, Helm et al. 2010).

O molusco *Pomacea canaliculata* é encontrado na Região Neotropical, habitando águas de curso lento e estagnado, estivando no solo nos períodos de seca (Lum-Kong & Kenny 1989, França et al. 2007). Sua ocorrência tem sido relatada no Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia, sendo abundante nas bacias dos rios da Prata, Uruguai e Paraguai (Thiengo, 1995, Seuffert & Martín, 2013). Esta espécie já foi encontrada infectada naturalmente por *Angiostrongylus cantonensis*, agente da meningite eosinofílica humana. (Tsai et al. 2001, Lv et al. 2009, Chen et al. 2011, Thiengo et al. 1998, Qiu et al. 2011).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a susceptibilidade deste molusco à infecção por *A. vasorum* e o comportamento biológico à infecção.

## MATERIAL E MÉTODOS

Oitenta espécimes de *Pomacea* foram coletados na orla da lagoa da Pampulha no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (19° 52'S e 43° 58' W) e levadas para a criação no Laboratório de Helminologia Veterinária do Instituto de Ciências

Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A identificação dos espécimes coletados foi feita de acordo com Rawlings et al. (2007). Os moluscos foram mantidos em cubas plásticas retangulares (16 x 22 x 30 cm) com tampa perfurada (2 mm intercalados a cada 2 cm da área), com 8 espécimes em cada, contendo água isenta de cloro e colmos de bambus, sendo expostas a um fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. A cada 7 dias a água das cubas foi trocada e os espécimes alimentados com folhas de alface. Cada desova obtida era retirada e transferida para cuba de criação medindo 10 x 10 x 14 cm e apenas os moluscos que eclodiram destas desovas (denominada primeira geração -F1- livres de infecção natural) foram usadas durante o experimento. Quando os moluscos atingiram 30 mm em torno de 60 dias foram utilizados 282 exemplares nos experimentos sendo que 182 foram colocados, individualmente, em um frasco de polipropileno (4 cm x 5 cm x 7 cm) contendo 1 mL de água com 500 L1 de *A. vasorum*, recuperadas de fezes de cães parasitados por *A. vasorum*. Os moluscos permaneceram nos frascos por 6h em temperatura ambiente e após este período foram transferidos para uma cuba de criação. O conteúdo restante nos frascos de infecção foi examinado e as larvas remanescentes foram contadas.

A partir do 5º dpi até o 30º dpi, 7 moluscos foram escolhidos aleatoriamente, sacrificados individualmente em placa de Petri com bastão de vidro e os tecidos e as conchas foram macerados, acondicionados em gaze cirúrgica e alocados em aparelho de Baermann, durante 12 horas para a recuperação das larvas. As quais foram identificadas e contadas segundo Barçante et al. (2003).

Para comparar aspectos biológicos como reprodução, crescimento e taxa de sobrevivência dos moluscos infectados e não infectados foram utilizados 100 exemplares com tamanho de 30 mm. 50 espécimes infectados com 500 L1, conforme metodologia descrita anteriormente e 50 espécimes não infectados. Os moluscos foram acompanhados por 120 dias, e as desovas dos grupos infectados e não infectados foram separados e analisados para comparar a reprodução durante o experimento. O número de ovos por desova foi quantificados e o cálculo da taxa de eclosão, considerando o número total de ovos e o número de moluscos nascidos.

Para comparar o crescimento, todos os moluscos infectados e não infectados foram mensurados com auxílio de paquímetro aos 120 dias após a eclosão. A taxa de crescimento foi calculada levando em consideração o tamanho inicial e o tamanho final.

### *Análise estatística*

Os dados referentes a desova, eclosão e crescimento de *P. canaliculata* foram analisados pelo teste de variância com um critério, seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## **RESULTADOS**

Embora permanecessem em contato direto com as L1 de *A. vasorum* a penetração média por molusco foi de 24% (120 L1 por molusco) e variando de 76 a 175 L1 (15,2% a 35% respectivamente).

A Tabela 1 apresenta o número de larvas recuperadas de sete *P. canaliculata* sacrificada a cada dia, variando entre 329 (39,2%) a 567 (67,5%) larvas. As porcentagens foram calculadas considerando que a taxa real de infecção (larvas que penetraram) com média de 120 L1 por molusco.

A maior taxa de recuperação de L1 foi no 6° dpi (512 larvas, 60,9%), a L2 foi no 18° dpi (520, 61,9%) e L3 recuperou maior quantidade no 29° dpi (567, 67,5%). No 5° até o 10° dpi, 100% das larvas recuperadas foram L1. O término da recuperação de L1 ocorreu no 19° dpi. A partir do 11° dpi recuperaram-se 64% de L2, estas foram recuperadas até o 25° dpi com 35%. No 19° dpi houve recuperação dos três estádios evolutivos sendo que 2% das larvas recuperadas foram L1, 91% de L2 e 7% para L3. A maior recuperação de L2 em ocorreu no 18° dpi (92%). O início da recuperação de L3 ocorreu no 19° dpi (7%) e a partir do 26° dpi somente L3 foram recuperadas. Os moluscos foram susceptíveis à infecção por *A. vasorum*, sendo recuperadas larvas vivas durante o período experimental.

Em relação ao comportamento biológico de *P. canaliculata* após a infecção, as desovas foram depositadas nos colmos de bambu e durante o período de acompanhamento, foram avaliadas 50 desovas para os moluscos infectados e para os não infectados. Sendo que o número médio de ovos por desovas nos moluscos infectados ( $207 \pm 18,12$ ) foi maior do que nos moluscos não infectados ( $160 \pm 12,14$ ) ( $p < 0.0001$ ).

A eclosão dos moluscos iniciou aos 12 dias após a postura da desova com temperatura ambiental média de 27°C. Os moluscos não infectados apresentaram maior

taxa de eclosão por desova ( $68\% \pm 3,52$ ) quando comparado aos moluscos infectados ( $55,8\% \pm 2,93$ ).

Tabela 1: Recuperação de larvas de *Angiostrongylus vasorum* de *Pomacea canaliculata* infectadas com 500 L1 de *A. vasorum*. Percentual de larvas recuperadas foi calculado baseando na taxa real de infecção que foi em média 120 L1 por molusco.

Dias após a infecção	Número total de larvas recuperadas dos 7 moluscos	Percentual (%) de larvas recuperadas	Número de larvas recuperadas		
			L1	L2	L3
5	454	54.04	454	0	0
6	512	60.95	512	0	0
7	403	47.97	403	0	0
8	427	50.83	427	0	0
9	329	39.17	329	0	0
10	442	52.61	442	0	0
11	466	55.47	168	298	0
12	425	50.59	89	336	0
13	341	40.59	58	283	0
14	384	45.71	50	334	0
15	401	47.73	36	365	0
16	358	42.61	21	337	0
17	468	55.71	23	445	0
18	520	61.9	42	478	0
19	458	54.52	9	417	32
20	388	46.19	0	369	19
21	440	52.38	0	387	53
22	388	46.19	0	264	124
23	471	56.07	0	221	250
24	468	55.71	0	187	281
25	392	46.67	0	137	255
26	443	52.73	0	0	443
27	520	61.9	0	0	520
28	477	56.78	0	0	477
29	567	67.5	0	0	567
30	481	57.26	0	0	481

O crescimento dos moluscos foi influenciado pela infecção, os moluscos não infectados apresentaram maior tamanho de concha ( $56 \pm 1,40$  mm) quando comparado ao grupo infectado ( $46 \text{ mm} \pm 1,77$ ) ( $p < 0.0001$ ), na avaliação aos 120 dias após a eclosão.

Não houve diferença estatística na sobrevivência entre os moluscos infectados e não ( $p = 0,74$ ). Ao final do experimento, 41 exemplares dos moluscos não infectados sobreviveram enquanto os infectados apresentaram 40 exemplares.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, nesta infecção experimental, confirmam a viabilidade de *P. canaliculata* como hospedeiro intermediário de *A. vasorum*.

A baixa penetração de L1 no caramujo durante a infecção (15,2% a 35%) comparada a outros moluscos pode estar relacionada com a presença de opérculo em *P. canaliculata*. Esta estrutura pode funcionar como uma barreira física dificultando a penetração das larvas uma vez que outras espécies de moluscos que não possuem opérculo como *Omalonyx matheroni* a taxa de penetração de larvas é superior a 95,2% (Mozzer et al. 2011) e em *Biomphalaria glabrata* a taxa de penetração é maior que 90% (Pereira et al. 2006).

Em relação a cinética de desenvolvimento do parasito em *P. canaliculata* foram observadas L1 até o 19° dpi, L2 entre 11° e 25° dpi e L3 a partir do 19° dpi. No presente estudo, o tempo para desenvolvimento de *A. vasorum* em *P. canaliculata* é maior em comparação com as demais espécies de moluscos já estudados. Guilhon & Afghahi (1969) recuperaram larvas de terceiro estágio a partir do 16° dpi em diversas espécies de gastrópodes infectados com *A. vasorum*. Sauerlander & Eckert (1974) ao realizarem a infecção experimental de *A. fulica* com *A. vasorum*, recuperaram L3 no 17° dpi. No trabalho de Barçante (2006) em *B. glabrata* infectados com a mesma linhagem de *A. vasorum* deste trabalho, o desenvolvimento da L2 deu-se no 5° dpi e de L3 no 15° dpi. Bessa et al. (2000) utilizando *Subulina octona* observou L2 ao 7° dpi e L3 ao 13° dpi. Mozzer et al. (2011) obtiveram em *O. matheroni* L2 no 5° dpi e L3 no 10° dpi.

A taxa de recuperação de L3 em *P. canaliculata* variou de 39,17% a 67,5%, entretanto, Barçante et al. (2003) também utilizando a técnica de Baermann, recuperaram cerca de 33% de L3 em *B. glabrata*. Já Mozzer et al. (2011) ao infectarem *O. matheroni* recuperaram entre 78% a 95% de L3.

Como pode ser observado o desenvolvimento dos estádios evolutivos de *A. vasorum* em *P. canaliculata* demanda maior tempo para a mudança dos estádios larvais que nos moluscos já estudados, porém são desconhecidos os mecanismos que retardam esse desenvolvimento. Sabe-se que em temperaturas mais baixas há um atraso na mudança de estádios (Gerichter 1948, Lv et al. 2006). Porém, durante o período experimental, a temperatura média foi de 27°C excluindo a influência da temperatura. Outros estudos relatam que a diferença no padrão de resposta celular e no desenvolvimento larval em moluscos depende do sistema interno de defesa do molusco (Iwanaga & Lee, 2005). São necessários estudos envolvendo o sistema imune do molusco para entender o mecanismo dessa interação parasito-hospedeiro.

Em relação aos aspectos biológicos de desenvolvimento do molusco infectado, neste trabalho o número de ovos por desova foi maior no grupo infectado com *A. vasorum* (Grupo A), mas a taxa de eclosão foi menor. Este fato é corroborado em outras espécies de moluscos e trematódeos como *B. glabrata* infectada com *Echinostoma paraensei*, em *Lymnaea stagnalis* infectada por *Trichobilharzia ocellata* e *B. glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*, o aumento das desovas ocorreu após a eliminação das cercárias (Tunholi et al. 2011, Schallig et al. 1992, Brumpt 1941, Etges & Gresso 1965). Provavelmente o molusco infectado pode desovar mais vezes devido a uma compensação na fecundidade para aumentar seus esforços reprodutivos e assim, compensar as perdas causadas pelo estresse da infecção (Minchella 1985). Tunholi et al. (2011) relatam que o molusco infectado apresenta um aumento na desova, mas a viabilidade dos ovos diminuem devido a redução da eficiência reprodutiva corroborando com este estudo quando foi observado menor taxa de eclosão no grupo infectado.

Em relação ao desenvolvimento do tamanho da concha de *P. canaliculata* infectada com *A. vasorum*, o grupo infectado apresentou um desenvolvimento menor do tamanho da concha em relação ao grupo controle, resultados semelhantes aos obtidos por Sauerlander & Eckert (1974) ao infectar *A. fulica* com 20.000 L1 de *A. vasorum*, observaram retardo no crescimento e deformações na concha.

*P. canaliculata* apresentou baixa mortalidade durante o experimento, nove para o grupo controle e dez para os infectados, de 50 moluscos em cada grupo. No estudo de Sauerländer & Eckert (1974) relatou alta taxa de sobrevivência de *A. fulica* infectado com *A. vasorum* durante o experimento, mostrando a resistência dos moluscos para este

parasito e com isso apresenta um fator positivo para a dispersão do parasito pelo ambiente.

Este estudo descreve pela primeira vez a infecção experimental de *P. canaliculata* com larvas de *A. vasorum* comprovando o potencial deste molusco como hospedeiro intermediário do parasito. Além disso, esses dados ressaltam a inespecificidade da relação parasito-hospedeiro intermediário em *A. vasorum*.

## REFERENCIAS

Barçante TA, Barçante JM, Dias SR, Lima WS 2003. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitol Res.* 91:471-475.

Barçante JM, Barçante TA, Dias SR, Vieira LQ, Lima WS, Negrão-Corrêa D 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first stage larvae from dog feces. *Parasitology Research* 89: 89-93.

Barçante TA 2006. *Aspectos do desenvolvimento de Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 179pp.

Barçante JMP 2004. Aspectos parasitológicos, clínicos e imunológicos de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamesnky, 1905. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 178pp.

Bessa ECA, Lima WS, Daemon E, Cury MC, Araujo JLB 2000. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensky (Nematoda: Angiostrongylida) em *Subulina octona* Bruguerre (Mollusca: Subulinidae) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 17: 29-41.

Bolt G, Monrad J, Koch J, Jesen AL 1993. The common frog (*Rana temporaria*) as a potencial paratecnic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitology Research* 79: 428-430.11.

Brumpt E 1941. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. *Annales de Parasitologie* 18: 9–45.

Chen R, Tong Q, Zhang Y, Lou D, Kong Q, Lv S, Zhuo M, Wen L, Lu S 2011. Loop-mediated isothermal amplification: rapid detection of *Angiostrongylus cantonensis* infection in *Pomacea canaliculata*. *Parasitology Vectors* 4: 204.

Etges FJ, Gresso W 1965. Effect of *Schistosoma mansoni* Infection upon Fecundity in *Australorbis glabratus*. *The Journal of Parasitology* 51: 757–760.

França RS, Suriani AL, Rocha O 2007. Composição das espécies de moluscos bentônicos nos reservatórios do baixo rio Tietê (São Paulo, Brasil) com uma avaliação do impacto causado pelas espécies exóticas invasoras. *Revista Brasileira de Zoologia* 24:41-51.

Gerichter C B 1948. Observations on the life history of lung nematodes using snails as intermediate hosts. *American Journal of Veterinary Research* 9: 109–112.

Guilhon J, Afghahi A 1969. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet 1866) in organisms of various species of terrestrial molluscs. *Série D: Sciences naturelles* 268: 434-6.

Guilhon J, Cens B 1969. Migrations et évolution d'*Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) dans l'organisme du chien. *Série D: Sciences naturelles* 269: 2377-80.

Helm JR, Morgan ER, Jackson MW, Wotton P, Bell R 2010. Canine angiostrongylosis: an emerging disease in Europe. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 20: 98-109.

Koch J, Willesen JL 2009. Canine pulmonary angiostrongylosis: an update. *The Veterinary Journal* 179: 348-359.

Iwanaga S, Lee BL 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38: 128-150.

Lima WS, Araujo Costa HM, Guimaraes MP, Leite AC 1985. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) nematoda: protostrongylidae, in dogs of Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 80: 233– 235.

Lum-Kong A, Kenny JS 1989. The reproductive biology of the ampullariid snail *Pomacea urceus* (Müller). *Journal of molluscan studies* 55: 53-65.

Lv S, Zhang Y, Liu HX, Hu L, Yang K, Steinmann P, Chen Z, Wang LY, Utzinger J, Zhou XN 2009. Invasive Snails and an Emerging Infectious Disease: Results from the First National Survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Neglected tropical diseases* 3:e368.

Minchella DJ 1985. Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology* 90: 205–216.

Morgan ER, Shaw SE, Brennan SF, De Waal TD, Jones BR, Mulcahy GM 2005. *Angiostrongylus vasorum*: a real heartbreaker. *Trends in Parasitology* 21: 49-51.

Mozzer LR, Montresor LC, Vidigal TH, Lima WS 2011. *Angiostrongylus vasorum*: Experimental Infection and Larval Development in *Omalonyx matheroni*. *Journal of Parasitology Research* 2011: 1-4.

Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Coelho PM, Lima WS, Negrão-Corrêa D 2006. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 98: 224-233.

Qiu JW, Chan MT, Kwong KL, Sun J 2011. Consumption, survival and growth in the invasive freshwater snail *Pomacea canaliculata*: does food freshness matter? *Journal of Molluscan Studies* 77:1-7.

Rawlings TA, Hayes KA, Cowie RH, Collins TM 2007. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC evolutionary biology* 7:97.

Rosen L, Ash LR, Wallace GD 1970. Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *American Journal of Veterinary Research* 31: 131-143.

Lv S, Zhou XN, Zhang YI, Liu HX, Zhu D, Yin WG, Steinmann P, Wang XH, Jia TW 2006. The effect of temperature on the development of *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935) in *Pomacea canaliculata* (Lamarck 1822). *Parasitology Research* 99: 583–587.

Sauerländer R, Eckert J 1974. The african giant snail (*Achatina fulica*) as experimental intermediate host of *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 44: 59–72.

Schallig HD, Sassen MJ, Jong-Brink M 1992. In vitro release of the antigonadotropic hormone, Schistosomin, from the central nervous system of *Lymnaea stagnalis* is induced with a methanolic extract of cercariae of *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology* 104: 309–314.

Seuffert ME, Martín PR 2013. Juvenile growth and survival of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) reared at different constant temperatures. *Springerplus* 2: 312.

Thiengo SC, Fernandez MA, Boaventura MF, Storti MA 1998. A Survey of Freshwater Gastropods in the Microrregião Serrana of the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 233-234.

Thiengo S 1995. Sistemática e biogeografia família pilidae connoly: gênero pomacea (Perry, 1810). In: BARBOSA, FS., org. Tópicos em malacologia médica. 314pp

Tunholi VM, Lustrino D, Tunholi-AlvesVM, de Mello-Silva CC, Maldonado AJr, Rodrigues MdeL, Pinheiro J 2011. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 106:192-5.

Tsai HC, Liu YC, Kunin CM, Lee SS, Chen YS, Lin HH, Tsai TH, Lin WR, Huang CK, Yen MY, Yen CM 2001. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. *American Journal of Medicine* 111: 109–114.

Williams JF, Lindemann B, Padgett GA, Smith OL 1985. *Angiostrongylus* in a Greyhound. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 186: 1101- 1103.

## CAPÍTULO 3:

### *GALLUS GALLUS DOMESTICUS*: HOSPEDEIRO PARATÊNICO DE *ANGIOSTRONGYLUS VASORUM*

Lanuze Rose Mozzer & Walter dos Santos Lima.

#### RESUMO:

*Angiostrongylus vasorum*, parasito do sistema cardiorrespiratório em canídeos, possui ciclo biológico heteroxênico em que os hospedeiros intermediários são moluscos terrestres e aquáticos. Geralmente, os canídeos são infectados pela ingestão dos hospedeiros intermediários ou de hospedeiros paratênicos que contêm larvas infectantes (L3). No entanto, não há relatos de aves como hospedeiros paratênicos de *A. vasorum*. Para avaliar a susceptibilidade e a viabilidade de *Gallus gallus domesticus* como hospedeiro paratênico de *A. vasorum*, 17 frangos da linhagem Cobb foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Os animais do grupo A foram inoculados com L3 de *A. vasorum*, e os do grupo B ingeriram moluscos infectados com L3 de *A. vasorum*. Aos trinta dias pós-infecção, os frangos foram sacrificados, e os músculos e órgãos foram colocados numa solução de HCl-pepsina (1% de HCl (37%), 1% de pepsina) durante 3 horas em estufa a 40 ° C para recuperar L3. No grupo A, 1.863 L3 foram recuperadas por frango. No grupo B, 2585 L3 foram recuperadas. Um cão que ingeriu órgãos e tecidos de uma galinha do grupo A eliminou larvas de *A. vasorum* em suas fezes 51 dias após a infecção. Aos 107 dias iniciou-se o tratamento com doses diárias de fenbendazol 25 mg / kg durante 21 dias. A permanência de L3 viável por 30 dias e a infecção do cão indicam que *Gallus gallus* é um potencial hospedeiro paratênico para este parasito.

#### INTRODUÇÃO:

*Angiostrongylus vasorum* (Baillet 1866) Kamensky (1905) é um parasito das artérias pulmonares e cardiovasculares entre os cães domésticos e os canídeos silvestres. Este parasito foi relatado na Europa, África, América do Norte e América do Sul,

incluindo o Brasil (Lima et al. 1985, Conboy 2011, Al - Sabi et al. 2013). Os animais infectados podem apresentar sinais clínicos isolados ou associados, tais como perda de peso, dispnéia, taquicardia, arritmias, tosse seca persistente, mucosas pálidas. Tromboses, coagulação intravascular disseminada e morte do animal também podem ser observados (Cury et al. 2002, Helm et al. 2010, Mozzer & Lima 2012). Estes sinais clínicos inespecíficos complicam o diagnóstico clínico da doença, pois, pode ser confundida com outras patologias, levando a uma subestimação da real situação epidemiológica. O ciclo biológico de *A. vasorum* é heteroxeno, e os hospedeiros intermediários são moluscos terrestres e aquáticos, como *Biomphalaria glabatra*, *Omalonyx matheroni* e *Achatina fulica*. Larvas de primeiro estágio (L1) nas fezes dos hospedeiros definitivos infectam os moluscos por penetração através do tegumento ou ingestão. Nos tecidos do molusco, ocorre o desenvolvimento em larva de segundo estágio e em larvas de terceiro estágio (L3) ou larvas infectantes (Rosen et al. 1970, Guilhon e Cens 1973, Grewal et al. 2003, Morley 2010, Mozzer et al. 2011).

A infecção do hospedeiro definitivo ocorre através da ingestão de moluscos contendo L3. Além disso, L3 pode sair ativamente do tegumento levando à contaminação de água e alimentos para animais (Barçante et al. 2003). Outro mecanismo através do qual os hospedeiros definitivos podem ser infectados é através da ingestão de hospedeiros paratênicos como anfíbios (Bolt et al. 1993).

## METODOLOGIA

Este experimento foi conduzido de acordo com as normas de bem-estar animal e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA / UFMG) sob o protocolo n ° 147/2011.

Um total de 17 frangos da linhagem Cobb, com 50 dias de idade, peso médio de 1.300 g, foram inoculados com L3 de *A. vasorum*. Os parasitos foram obtidos de 170 moluscos da espécie *Omalonyx matheroni*, que foram infectados individualmente usando placas de cultura de poliestireno com 10 poços (mm Fabricante: TPP). Um total de 500 L1 foram depositados em fragmentos de folhas de alface que foram ingeridos pelos moluscos, de acordo com a metodologia descrita por Mozzer et al. (2011). Um total de 25 dias após a infecção, 90 moluscos foram separados aleatoriamente em grupos

de 10. Os moluscos foram sacrificados, macerados e submetidos à técnica de Baermann (Barçante et al. 2003) durante 12 horas para recuperar L3. O número de larvas recuperadas a partir de cada grupo foram separadas, contadas utilizando um microscópio estereoscópico (25x) e colocado em tubos Falcon contendo 1 ml de soro fisiológico (0,9%). O número médio de larvas recuperadas foi de 3.850 L3 por grupo. Esta quantidade foi estabelecida como a carga para inoculação dos frangos.

Os frangos foram mantidos em jejum por 12 horas e divididos aleatoriamente em dois grupos.

Grupo A continha 9 frangos que foram inoculados individualmente com 3.850 L3 em 1 ml de água destilada, utilizando uma agulha de gavagem inserida diretamente dentro da cavidade oral.

Grupo B continha 8 frangos que foram inoculados através da ingestão de moluscos infectados com L3 de *A. vasorum*. As aves foram alojadas em gaiolas individuais, onde permaneceram em observação até que completasse a ingestão dos 10 moluscos colocados dentro do comedouro de cada gaiola.

Após 30 dias da infecção, todos os frangos do grupo B e 8 do grupo A foram eutanasiados e necropsiados, seguindo a metodologia de Zander e Mallinson (1991). Depois de abrir o tórax e a cavidade abdominal, os seguintes órgãos e tecidos foram removidos e inspecionados por lesões macroscópicas: coração, pulmão, fígado, pâncreas, esôfago, proventrículo, ventrículo, intestino, ceco, cloaca, músculos R1 (músculos da região ventral-peitoral), músculos R2 (músculos da região dorsal), os músculos R3 (músculos da asa, coxa e perna) e R4 (músculos da região da cabeça e pescoço).

A musculatura foi desossada e juntamente com os órgãos foram cortados em fragmentos de 0,5 centímetros, colocados separadamente em recipientes de vidro e submetidos ao processo de digestão. Uma solução de HCl-pepsina (1% de HCl (37%), 1% de pepsina) foi utilizada durante 3 horas, em estufa a 40°C (Taira et al. 2004). A razão de tecido (g) e a solução de digestão (ml) foi de 1:10. Após esta digestão, os tecidos foram removidos, e os conteúdos foram examinados usando um microscópio estereoscópico (25x). As larvas recuperadas foram separadas, identificadas e contadas.

Para avaliar a viabilidade das L3 recuperadas, um frango do grupo A foi desossado, os músculos e órgãos foram seccionados em fragmentos de 0,5 centímetros e oferecidos a um cão macho, sem raça definida, com idade de 9 meses e peso de 6 kg. Após 30 dias da ingestão, foram realizadas coletas diárias das fezes deste cão para exames pelo método de Baermann para observar o período pré-patente. Após a eliminação de L1 nas fezes, a coleta passou a ser realizada em intervalos de 7 dias, com a última coleta realizada em 156 dias. No entanto, aos 107 dias após a infecção, o tratamento anti-helmíntico foi realizado com doses diárias de fenbendazol (Panacur, Intervet), 25mg/kg, durante 21 dias segundo o protocolo sugerido por Martin et al. (1993).

GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., EUA) foi utilizado para a análise estatística. Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as análises entre os grupos, foi utilizado o teste t de Student para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para identificar diferenças significativas entre as médias dos grupos, uma ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni foi utilizado para os dados paramétricos, e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi usado para dados não paramétricos. Todos os testes foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

## **RESULTADOS:**

Os frangos não tiveram alterações de apetite ou prostração durante o período experimental. Não foram observadas lesões macroscópicas nos órgãos e tecidos avaliados. As L3 recuperadas foram identificadas como larvas de *A. vasorum* com base em descrições relatadas por Lima et al. (1985). A quantidade de L3 recuperada dos órgãos examinados de cada frango estão apresentados são na Tabela 1. No grupo A, um total de 1.863 L3 foram recuperadas, e o número de larvas encontradas em cada frango variou de 172 a 291 L3 (4,5 a 7,6 % da carga de infecção). Nos tecidos dos animais do grupo B, que ingeriram moluscos infectados, um total de 2.585 L3 foram recuperadas; o número de L3 em cada animal variou de 276 a 395 L3 (7,2 a 10% da carga da infecção). No grupo A, a maior recuperação de larvas foi obtido a partir do ventrículo (46,8-58,9%), seguido pelos músculos da cabeça e pescoço (15,1-23,7%). No grupo B, a recuperação foi mais elevada no fígado (27,8-42,6%), seguido pelos músculos da região ventral-peitoral (22,1-36,8%), como apresentado na Tabela 1.

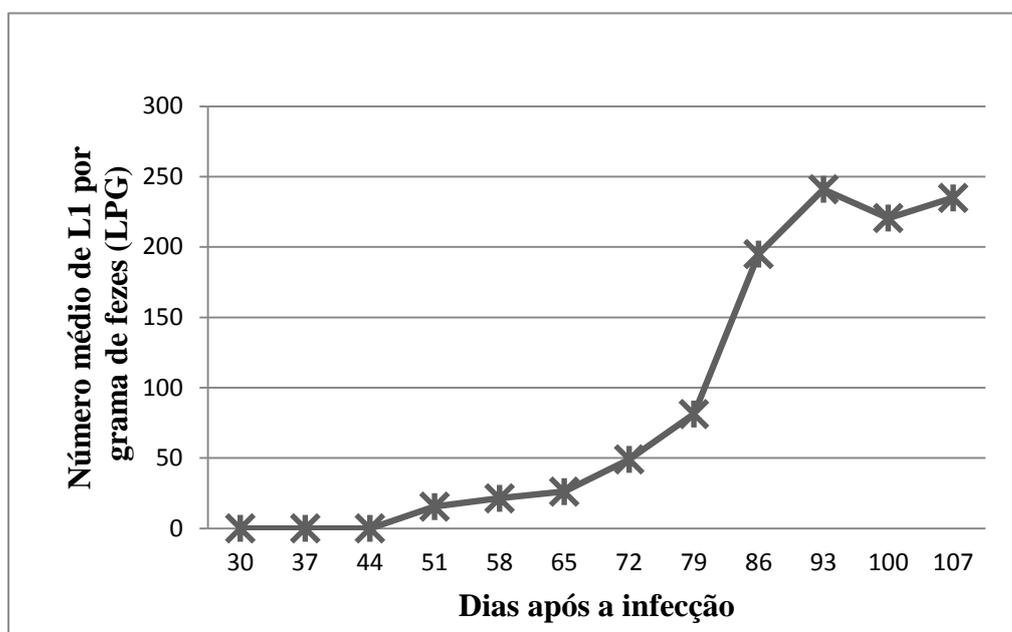
Tabela 1: Número de L3 de *Angiostrongylus vasorum* (L3) recuperadas de frangos inoculados diretamente com 3.850 L3 na cavidade oral (grupo A) e frangos que ingeriram *Omalonyx matheroni* infectados (grupo B).

MATERIAL AVALIADO	Larvas de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em cada frango 30 dias após a infecção																
	GRUPO A: inoculação oral de 3850 L3 por frango								GRUPO B: cada frango ingeriu 10 moluscos infectados								
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	
coração	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
pulmão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
fígado	42	35	27	51	18	29	47	25	108	95	152	143	102	94	105	77	
pancreas	0	0	0	0	4	0	2	0	0	14	0	7	0	2	6	0	
esofago	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
proventriculo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ventriculo	159	99	124	112	146	103	131	87	54	72	68	75	68	71	64	67	
musculatura R1	21	17	58	77	46	37	19	31	87	83	79	98	114	78	104	121	
musculatura R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
musculatura R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
musculatura R4	69	27	37	21	34	42	57	29	29	17	58	72	83	31	23	64	
Total por grupo	291	178	246	261	248	211	256	172	278	281	357	395	367	276	302	329	
Média por grupo	233								323								
Porcentagem de larvas recuperadas	7.6	4.6	6.4	6.8	6.4	5.5	6.6	4.5	7.2	7.3	9.3	10	9.5	7.2	7.8	8.5	

R1 = musculatura ventral - peitorais  
R2 = musculatura dorsal  
R3 = musculatura das asas e membros inferiores  
R4 = musculatura da cabeça e pescoço

O cão que ingeriu os órgãos e tecidos do frango sacrificado eliminou L1 de *A. vasorum* 51 dias após a ingestão. O animal não apresentou alterações clínicas durante o período de estudo. A partir de 28 dias após o tratamento com fenbendazol, as larvas não foram recuperadas nas fezes. A dinâmica de eliminação de L1 nas fezes é ilustrada no gráfico 1.

Gráfico 1: Dinâmica da eliminação de larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas das fezes do cão após a ingestão de tecidos e órgãos de frangos alimentados com *Omalonyx matheroni* infectados com larvas de *A. vasorum*.



## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES:

Trinta dias após a infecção dos frangos, foram recuperadas L3 vivas. A infecção dos frangos por inoculação oral direta das larvas provavelmente apresenta um percurso diferente de infecção do que a ingestão de moluscos infectados porque a distribuição de larvas nos órgãos e tecidos dos frangos foram significativamente diferentes com base na via de infecção ( $p = 0,0001$ ). Infecção direta resultou numa concentração mais elevada de L3 no ventrículo e da musculatura da região da cabeça e pescoço. A infecção por ingestão de moluscos infectados resultou na maior concentração de L3 recuperadas no fígado, seguindo-se o ventrículo, os músculos ventrais, os músculos da cabeça e pescoço e do pâncreas.

A ingestão de moluscos infectados permitiu que as L3 atingissem órgãos tais como o fígado, em quantidades superiores a infecção direta com L3 na cavidade oral do frango. O processo de digestão no trato gastrointestinal pode ter destruído algumas das

larvas inoculadas, enquanto que a digestão do tecido molusco pode ter favorecido a fuga das larvas após a ingestão dos moluscos infectados. Este cenário é consistente com a diferença observada no número de larvas recuperadas. Além disso, a infecção por meio da ingestão de moluscos infectados é uma estimativa do número médio de larvas que foram inoculadas em cada frango. Existe uma variação individual na recuperação de L3 em cada molusco, como demonstrado por Mozzer et al. 2011. Esses autores ao infectar moluscos do gênero *Omalonyx* observaram que alguns indivíduos apresentaram maior recuperação de L3 devido a maior quantidade de L1 que penetraram durante a infecção do molusco. Este fato leva a valores estimados para o número de larvas recuperadas. Ao fornecer moluscos infectados, o número exato de larvas dentro do molusco não é conhecido, mas pode ser estimado a partir do número de larvas encontradas em órgãos e tecidos dos frangos do grupo B.

A eliminação de L1 nas fezes do cão comprova que o ciclo de vida de *A. vasorum* se completa em laboratório utilizando frangos como hospedeiro paratênicos. O período pré-patente de 51 dias, corrobora com o período pré-patente descrito em literatura que cita a variação de eliminação de larvas nas fezes entre 28 e 108 dias após a infecção (Oliveira-Junior et al. 2006, Mozzer et al. 2011). O uso de fenbendazol foi uma abordagem terapêutica eficaz para o tratamento do cão, como se observa em outros estudos de cães infectados com *A. vasorum* e tratados com o mesmo princípio ativo (Martin et al. 1993, Brennan et al. 2004).

Estes resultados têm valor epidemiológico, porque apresentam *Gallus gallus* como um potencial hospedeiro paratênico. Hospedeiros paratênicos podem ser um importante elo no ciclo deste parasita. As aves podem ser particularmente importantes porque representam aproximadamente 21,5% do alimento consumido pelos canídeos via predação (Motta-Júnior 1994, Uchôa 2004). Nas fazendas da família em núcleos agrícolas, as aves são normalmente criadas em sistemas de vida livre, onde se alimentam de grãos, frutas, insetos, minhocas, caracóis terrestres e muitos outros tipos de matéria vegetal e animal (Costa et al. 2008, Oliveira et al. 2009). Na presença desta grande diversidade, existe um biossistema que fornece o fechamento de muitos ciclos de parasitas no ambiente e facilita a predação destas aves por canídeos. Este estudo confirma a viabilidade de *Gallus gallus domesticus* como hospedeiro paratênico de *A. vasorum*.

## REFERENCIAS

Al-Sabi MNS, Kapel CM, Johansson A, Espersen MC, Koch J, Willeesen JL 2013. A coprological investigation of gastrointestinal and cardiopulmonary parasites in hunting dogs in Denmark. *Vet. Parasit.* 196: 366-372.

Barçante TA, Barçante JM, Dias SR, Lima WS 2003. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitol Res.* 91:471-475.

Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, Vieira LQ, Lima WS, Negrão- Corrêa D 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol. Res.* 89: 89–93.

Bolt G, Monrad J, Frandsen F, Henriksen P, Dietz HH 1993. The common frog (*Rana temporaria*) as a potential paratenic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol. Res.* 79: 428–430.

Brennan SF, McCarthy G, McAllister H, Bassett H, Jones BR 2004. Clinical signs, diagnosis and treatment of three dogs with angiostrongylosis in Ireland. *Ir. Vet. J.* 57: 103-9.

Conboy GA 2011. Canine angiostrongylosis: The French heartworm: An emerging threat in North America. *Vet. Parasit.* 176: 382-389.

Costa KS, Santos SL, Uzeda RS, Pinheiro AM, Almeida MA, Araujo FR, Mcallister MM, Gondim LF 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Intern. Journal Parasitol.* 38, 157-159.

Cury MC, Lima WS, Guimarães MP, Carvalho MG 2002. Hematological and coagulation profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Vet. Parasit.* 104: 139–149.

Grewal PS, Grewal SK, Tan L, Adams BJ 2003. Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends. *J. Nematol.* 35: 146–156.

Guilhon J, Cens B 1973. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Etude biologique et morfologique. *Ann. Parasitol.* 48: 567–596.

Helm JR, Morgan ER, Jackson MW, Wotton P, Bell R 2010. Canine angiostrongylosis: an emerging disease in Europe. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 20: 98-109.

Lima WS, Costa HMA, Guimarães MP, Leite ACR 1985. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) (Nematoda, Protostrongylidae) em cães de Minas Gerais, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 80: 233-235.

Martin MWS, Ashton G, Simpson VR, Neal C 1993. Angiostrongylosis in Cornwall – Clinical presentations of 8 cases. *J. Small Animal Practice* 34: 20–25.

Morley NJ 2010. Aquatic molluscs as auxiliary hosts for terrestrial nematode parasites: implications for pathogen transmission in a changing climate. *Parasit.* 137: 1041–1056.

Motta-Junior JC, Lombardi JA, Talamani SA 1994. Notes on crab-eating fox (*Dusicyon thous*) seed dispersal and food habits in southeastern Brazil. *Mammalia.* 58: 156-159.

Mozzer LR, Montresor LC, Vidigal THDA, Lima WS 2011. *Angiostrongylus vasorum*: Experimental Infection and Larval Development in *Omalonyx matheroni*. *J Parasitol Research.* 2011:1-4.

Mozzer LR, Lima WS 2012. Rupture of the thoracic aorta associated with experimental *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog. *Parasite (Paris).* 19: 189-191.

Oliveira LN, Costa Junior LM, Melo CF, Ramos Silva JC, Bevilaqua CM, Azevedo SS, Muradian V, Araújo DA, Dubey JP, Gennari SM 2009. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the northeast region of Brazil. *J. Parasitol.* 95: 235-7.

Oliveira-Júnior SD, Barçante JM, Barçante TA, Dias SR, Lima WS 2006. Larval output of infected and re-infected dogs with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. *Vet. Parasitol.* 141: 101-6.

Rosen L, Ash LR, Wallace GD 1970. Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Am. J. Vet. Res.* 31: 131–143.

Uchoa T, Moura-Britto M 2004. Hábito alimentar e uso do habitat por canídeos no Parque Estadual do Cerrado: avaliação da situação atual da família Canidae no limite sul do bioma Cerrado no Brasil. *Cad. biodivers.* 4: 59-65.

Zander DV, Mallinson ET 1991. Principles of disease prevention: diagnosis and control. In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Bear, C.W., Reid, W.M., Yoder, H.W. Disease of poultry. 9<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, pp. 3-4.

## CAPÍTULO 4:

### TRANSMISSÃO PASSIVA DE ANTICORPOS ANTI- *ANGIOSTRONGYLUS VASORUM* EM CADELAS

Lanuze Rose Mozzer, Aytube Lucas Coaglio, Christina Monerat Toledo Machado,  
Ricardo Toshio Fujiwara e Walter dos Santos Lima.

#### RESUMO:

*Angiostrongylus vasorum* é um nematóide parasito do coração, artéria pulmonar e seus ramos, principalmente de canídeos domésticos e silvestres. Este estudo teve como objetivo analisar os aspectos parasitológicos da infecção na cadela gestante, detectar a existência de anticorpos anti-*A. vasorum* no leite materno de cadelas infectadas, analisar a cinética dos anticorpos anti-*A. vasorum* no soro dos seus respectivos filhotes e avaliar a cinética de eliminação de larvas de primeiro estágio (L1) de *A. vasorum* nas fezes das cadelas nas fases de estro, gestação e lactação. Foram acompanhadas seis cadelas, sem raça definida, pluríparas, parasitadas por *A. vasorum*. Foram realizadas, quinzenalmente, coletas de sangue das cadelas e seus respectivos filhotes a partir dos 15 dias até os 180 dias após o nascimento dos filhotes (ANF) para acompanhamento da cinética dos anticorpos anti-*A. vasorum* por meio de exames de ELISA indireto. Amostras de leite foram coletadas no dia 15 e 30 ANF para análise do leite quanto a presença de larvas e análise do soro quanto a presença de anticorpos. Fezes e amostras de sangue para dosagem de progesterona, LH e prolactina foram coletadas semanalmente ao longo do ciclo reprodutivo, gestação e lactação. Houve transferência de anticorpos anti-*A. vasorum* para os filhotes e estes diminuem ao longo do tempo em relação aos valores encontrados na genitora. Até os 45 dias ANF foram detectados anticorpos no soro de todos os filhotes e aos 90 dias ANF apenas 1 filhote apresentou reação ao antígeno. Após 105 dias não houve reação ao antígeno em nenhum dos soros dos filhotes. Nenhuma forma larvária foi detectada nas amostras de leite. O soro do leite apresentou anticorpos aos 15 dias ANF aos 30 dias ANF não foi detectado reação antígeno-anticorpo. Houve eliminação de L1 de *A. vasorum* nas fezes da cadela em todas as fases reprodutivas. Sendo que na segunda metade do período gestacional houve

um aumento da quantidade de larvas nas fezes. Aumento este que coincidiu com o aumento dos níveis de prolactina nas cadelas gestantes.

## **INTRODUÇÃO:**

*Angiostrongylus vasorum* é um nematoide que parasita o sistema cardiorespiratório de canídeos domésticos e silvestres. Possui ciclo de vida indireto tendo como hospedeiros intermediários moluscos aquáticos e terrestres (Mozzer et al. 2011). Os animais parasitados apresentam sinais diversos incluindo problemas respiratórios, distúrbios de coagulação, envolvimento neurológico e morte (Chapman et al. 2004, Garosi et al. 2005, Wessmann et al. 2006, Mozzer & Lima 2012). Animais com doença subclínica também são relatados e não existem estudos envolvendo a transferência de anticorpos anti- *A. vasorum* maternos aos filhotes.

Os níveis de imunoglobulinas no colostro e no leite são dependentes das espécies de animais. Nos mamíferos os mecanismos de transmissão de anticorpos são geralmente classificados em três tipos de acordo com o percurso: a via transplacentária que ocorre em humanos, a via transcolostral como ocorre em equinos e bovinos e a via intermediária entre estes dois tipos, que transfere tanto pela placenta quanto pelas secreções mamárias como observado em cães, gatos e roedores (Brambell 1958, Hurley 2003, Butler et al. 2005). Para animais como ratos, camundongos, cães e ungulados a captação de colostro de qualidade e quantidade suficiente é importante para a prole aumentar a função imunológica sistêmica.

A placenta de cães é classificada histologicamente segundo Kaufmann e Burton (1994) como endoteliochorial baseando-se no contato do epitélio coriônico fetal com a parede vascular (endotélio) dos capilares maternos. Como consequência, dentre as imunoglobulinas produzidas pelo organismo (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD), somente a IgG, em torno de 5 a 10%, é transferida para o feto no período intrauterino, as demais são transferidas pelas secreções mamárias, segundo Barreto e Prestes (2004).

O filhote canino apresenta-se em estado de imaturidade imunológica nos períodos iniciais do desenvolvimento, não sendo evidenciada competência plena até os três a quatro primeiros meses de idade (Blunden 2000). A proteção contra a infecção natural nas primeiras horas de vida é dada pela transferência passiva de imunoglobulinas da genitora a seus filhotes. Este estudo teve como objetivo analisar os

aspectos parasitológicos da infecção na cadela gestante, detectar a existência de anticorpos anti-*A. vasorum* no leite materno de cadelas infectadas, analisar a cinética dos anticorpos anti-*A. vasorum* no soro dos seus respectivos filhotes e avaliar a cinética de eliminação de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* nas fezes das cadelas nas fases de estro, gestação e lactação.

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

Este experimento foi conduzido de acordo com as normas de bem-estar animal e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA / UFMG) sob o protocolo n ° 147/2011.

**Animais:** Foram acompanhadas desde a fase de proestro reprodutivo seis cadelas, sem raça definida, com idade média de 30 meses, pluríparas parasitadas por *A. vasorum* e duas cadelas sem infecção como grupo controle. Foram utilizados três cães machos sem infecção para a monta natural.

**Manejo reprodutivo:** O acompanhamento reprodutivo e classificação da fase do ciclo estral foram realizados pela análise da citologia vaginal (Henson, 2003). Foi colocado um cão macho, sem raça definida, de tamanho inferior ao da cadela na mesma baia para que ocorresse a monta natural. Após a monta, os machos foram retirados das respectivas baias. A gestação foi confirmada a partir do 25º dia por meio de exames ultrassonográficos (aparelho ultrassonográfico: Kontron Sigma 21 transdutor 7.5MHz e wobbler 5MHz transdutor linear). Após a parição, os filhotes permaneceram junto com as respectivas genitoras por 45 dias. Após esse período, eles foram remanejados em baias separadas.

**Amostras de soro:** Foram realizadas, quinzenalmente, coletas de sangue por punção sanguínea da veia jugular das cadelas e seus respectivos filhotes a partir dos 15 dias até os 180 dias após o nascimento dos filhotes (ANF) para acompanhamento da cinética dos anticorpos anti-*A. vasorum* por meio de exames de ELISA indireto. Amostras de leite foram coletadas no dia 15 e 30 ANF para análise do leite quanto a presença de larvas e análise do soro quanto a presença de anticorpos. Para estabelecer o ponto de corte (“cut off”) dos exames foram coletadas amostras de sangue de 5 cadelas sem infecção ao

longo de 180 dias e a coleta de leite de 2 cadelas sem infecção aos 15 e aos 30 dias ANF.

A detecção de anticorpos foi realizada, utilizando antígeno de *A. vasorum* (0,5µg/ml) e os soros (sangue e leite) em diluição de 1:3200 em tampão de incubação (PBS/BSA 5%). A diluição de 1:3200 foi escolhida após diluição seriada dos soros, sendo esta a que apresentou a maior diferença nas leituras entre os positivos e negativos para a concentração do antígeno de *A. vasorum*.

**Amostras de fezes:** As cadelas tiveram as fezes coletadas semanalmente para o acompanhamento da eliminação larvária ao longo do ciclo reprodutivo, gestação e lactação.

**Acompanhamento hormonal:** Foi realizado coletas de amostras de sangue (5,0 mL) semanalmente a partir da fase de proestro reprodutivo para acompanhamento dos seguintes hormônios: progesterona, LH e prolactina. As dosagens hormonais foram realizadas em um laboratório veterinário de análises clínicas (TECSA-Tecnologia em Sanidade Animal).

**Testes estatísticos:** Os testes estatísticos utilizados neste estudo foram realizados por meio do programa GraphPad Prism® .

## **RESULTADOS:**

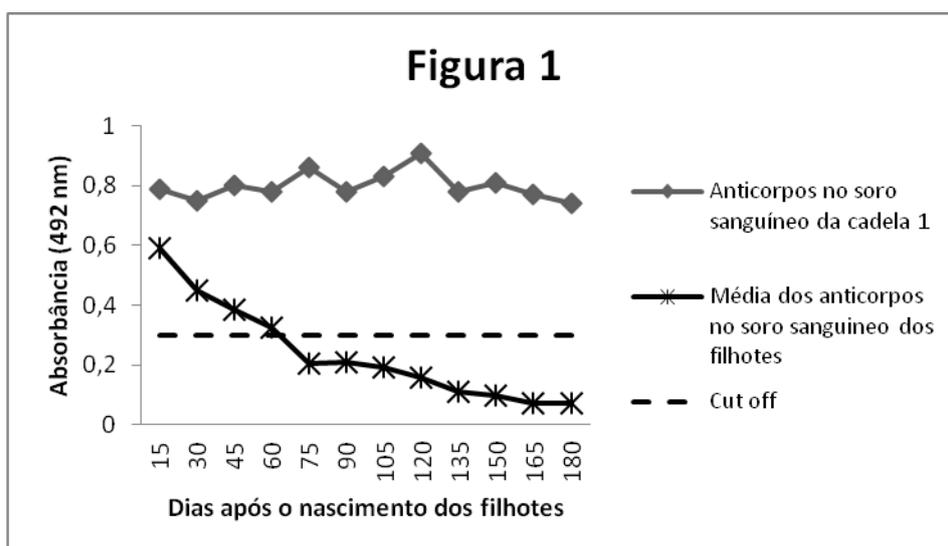
As seis cadelas infectadas tiveram diferentes tamanhos de ninhada e o tempo de gestação variando de 58 a 61 dias como apresentado na tabela 1.

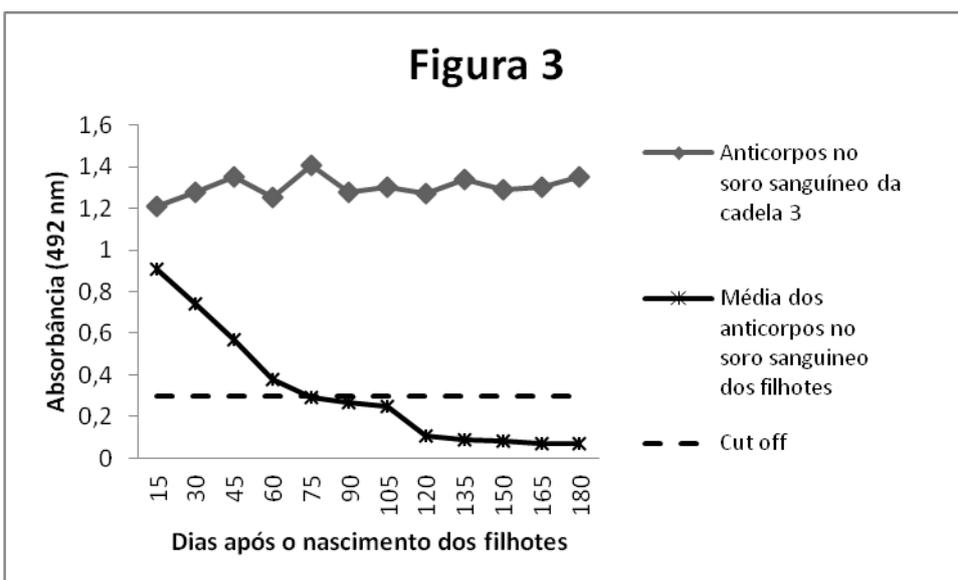
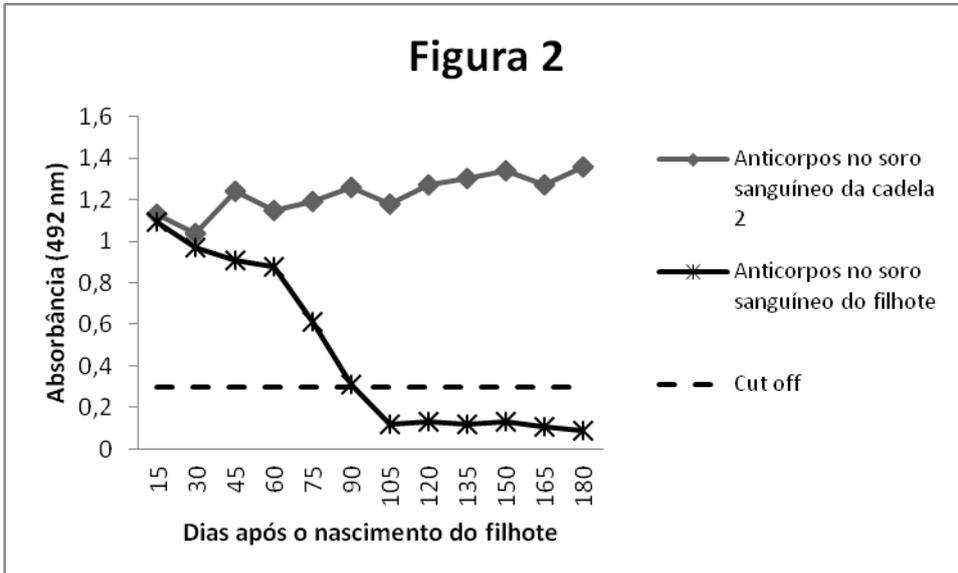
Tabela 1: Número de filhotes em cada ninhada de cadelas infectadas com *Angiostrongylus vasorum* e o tempo de gestação.

ANIMAL	Tempo de gestação (Dias)	NÚMERO DE FILHOTES (Identificação dos filhotes)
Cadela 1	58	5 filhotes (1.1; 1.2; 1.3; 1.4; 1.5)
Cadela 2	62	1 filhote (2.1)
Cadela 3	65	2 filhotes (3.2; 3.3)
Cadela 4	61	4 filhotes (4.1; 4.2; 4.3; 4.4)
Cadela 5	66	4 filhotes (5.1; 5.2; 5.3; 5.4)
Cadela 6	59	4 filhotes (6.1; 6.2; 6.3; 6.4)
C1-controle	62	3 filhotes (C11, C12, C13)
C2-controle	63	4 filhotes (C21, C22, C23, C24)

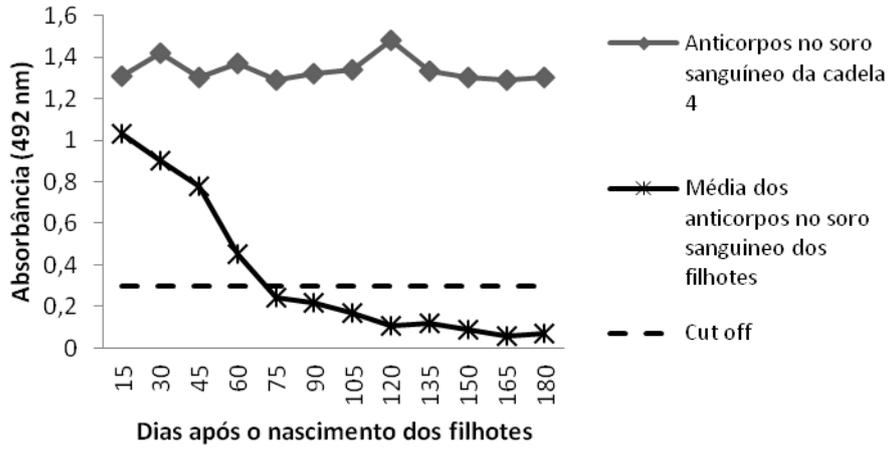
O perfil sorológico de anticorpos anti- *A. vasorum* das cadelas e de seus respectivos filhotes estão representadas pelas figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Figuras 1 a 6: Perfil sorológico de anticorpos anti- *A. vasorum* de cadelas e de seus respectivos filhotes até 180 dias de idade.

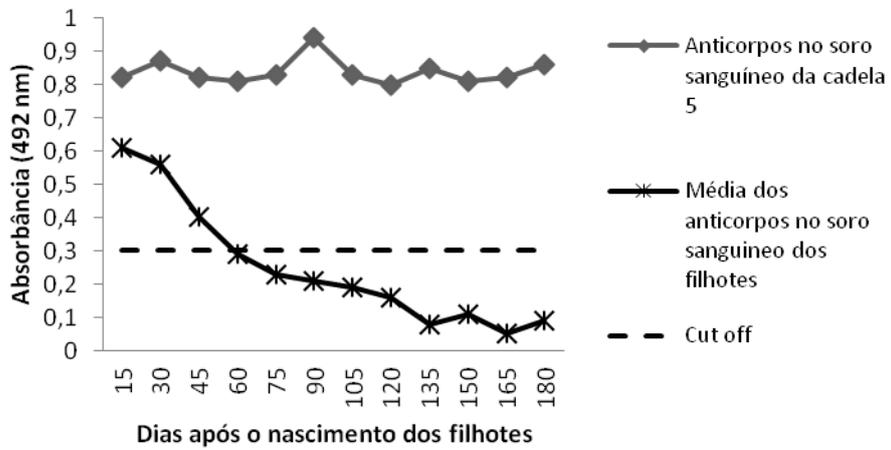


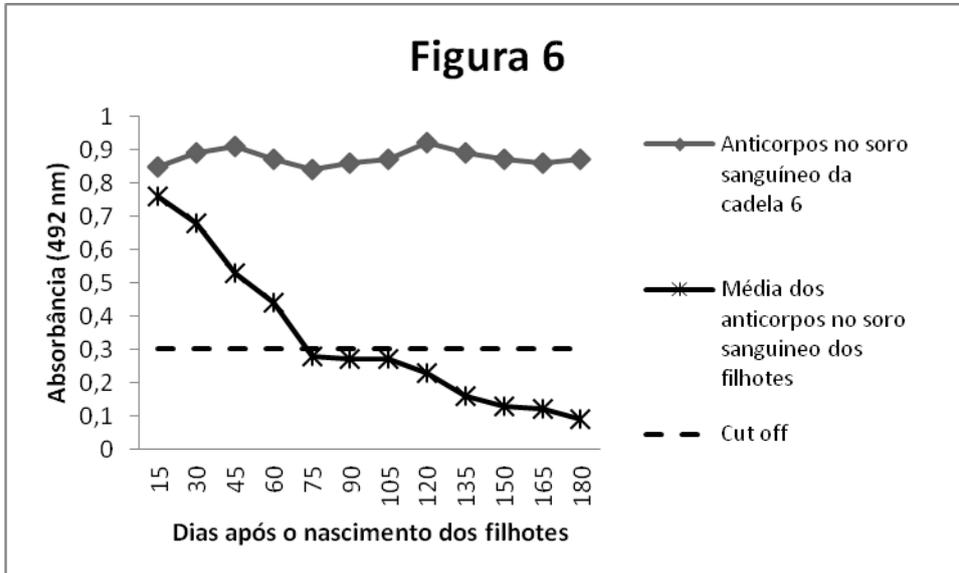


**Figura 4**



**Figura 5**





Os valores de anticorpos anti- *A. vasorum* nos filhotes diminuem ( $p=0,0001$ ) ao longo do tempo em relação aos valores encontrados na genitora. Até os 45 dias ANF foram detectados anticorpos no soro de todos os filhotes. Aos 60 dias ANF 17 filhotes (85%) apresentavam anticorpos circulantes, aos 75 dias ANF houve detecção no soro de 4 filhotes (2%) e aos 90 dias ANF apenas 1 filhote apresentou reação ao antígeno. Após 105 dias não houve reação ao antígeno em nenhum dos soros dos filhotes.

As amostras de leite foram examinadas e nenhuma forma larvária foi detectada. O soro do leite apresentou anticorpos aos 15 dias ANF (Fig.7) com valores próximos a dosagem realizada no soro sanguíneo materno e no soro sanguíneo dos filhotes e sem diferença estatística entre esses valores ( $p= 0,0001$ ). Aos 30 dias ANF (Fig.8) não foi detectado reação antígeno-anticorpo com o soro do leite das cadelas infectadas.

Figura 7: Perfil sorológico sanguíneo (IgG) de cadelas infectadas, cadelas controle, perfil sorológico médio de seus respectivos filhotes e soro do leite aos 15 dias após o nascimento dos filhotes (ANF).

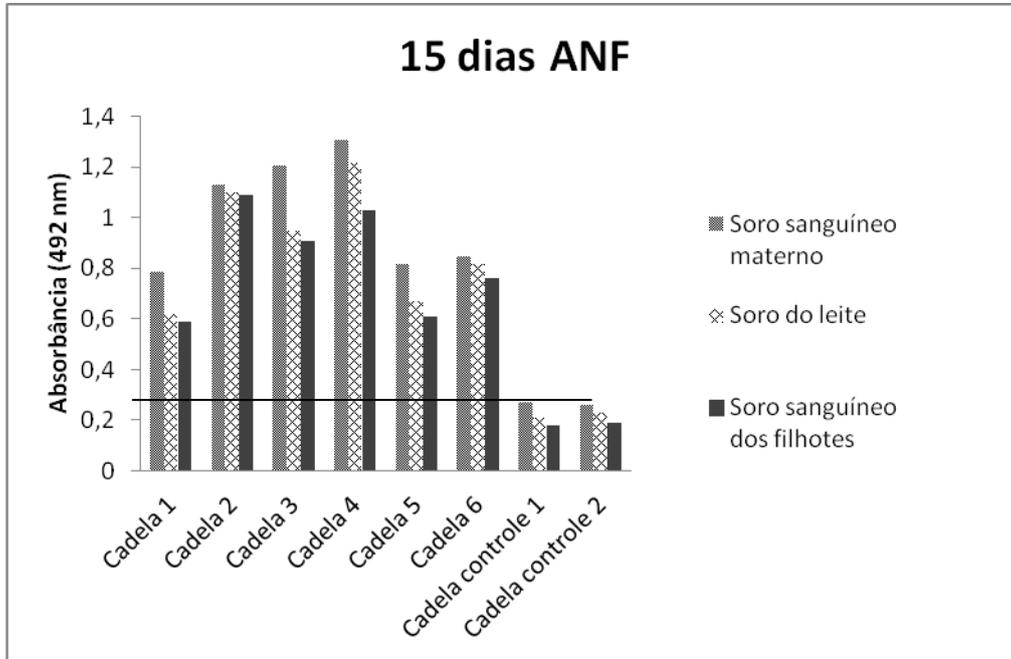
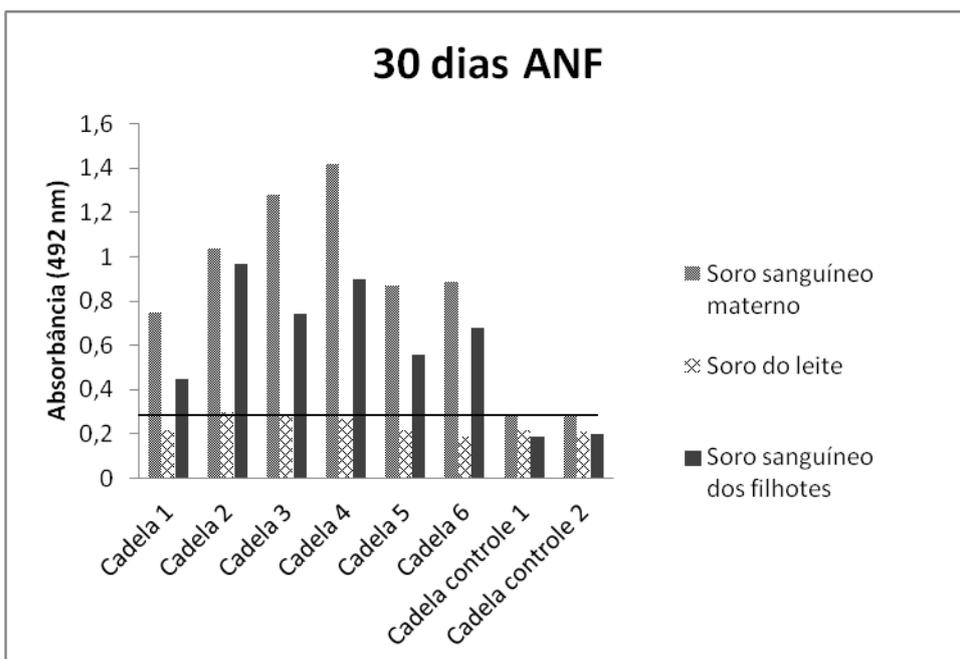


Figura 8: Perfil sorológico sanguíneo (IgG) de cadelas infectadas, cadelas controle, perfil sorológico médio de seus respectivos filhotes e soro do leite aos 30 dias após o nascimento dos filhotes (ANF).



Houve eliminação de L1 de *A. vasorum* nas fezes da cadela em todas as fases reprodutivas. Sendo que na segunda metade do período gestacional houve um aumento da quantidade de larvas nas fezes. Aumento este que coincidiu com o aumento dos níveis de prolactina nas cadelas gestantes. O pico dos níveis de LH que fisiologicamente antecede a ovulação nas cadelas não apresentou alteração significativa na eliminação larvária. O aumento dos níveis de progesterona durante o período gestacional também não alterou a dinâmica de eliminação.

FIGURA 9: Número de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* ao longo das fases de proestro, estro, período gestacional e período de lactação em cadelas infectadas e a dosagem média dos níveis de LH sérico.

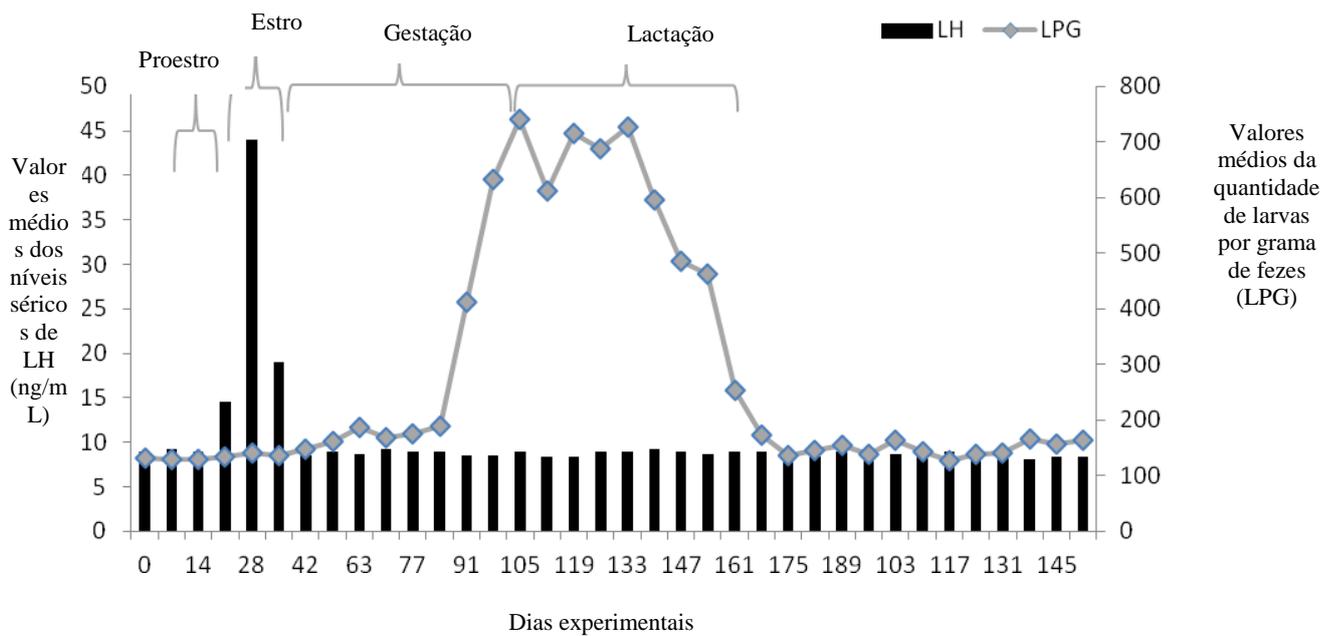


FIGURA 10: Número de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* ao longo das fases de proestro, estro, período gestacional e período de lactação em cadelas infectadas e a dosagem média dos níveis de progesterona sérico.

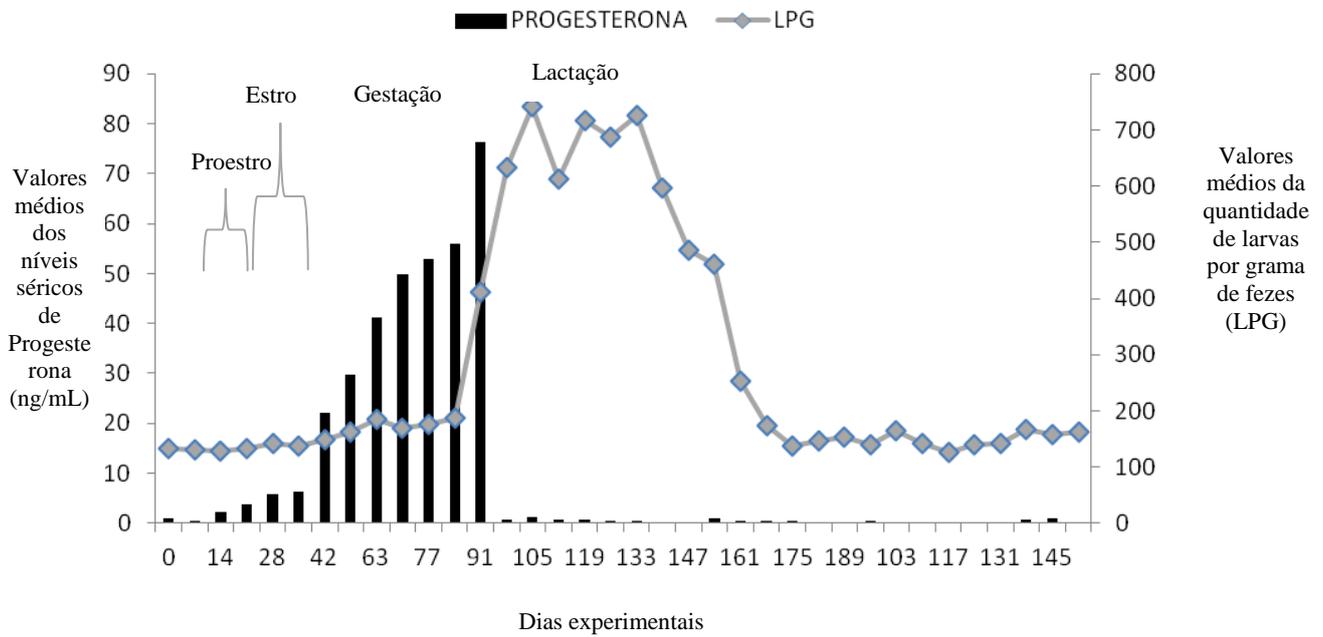
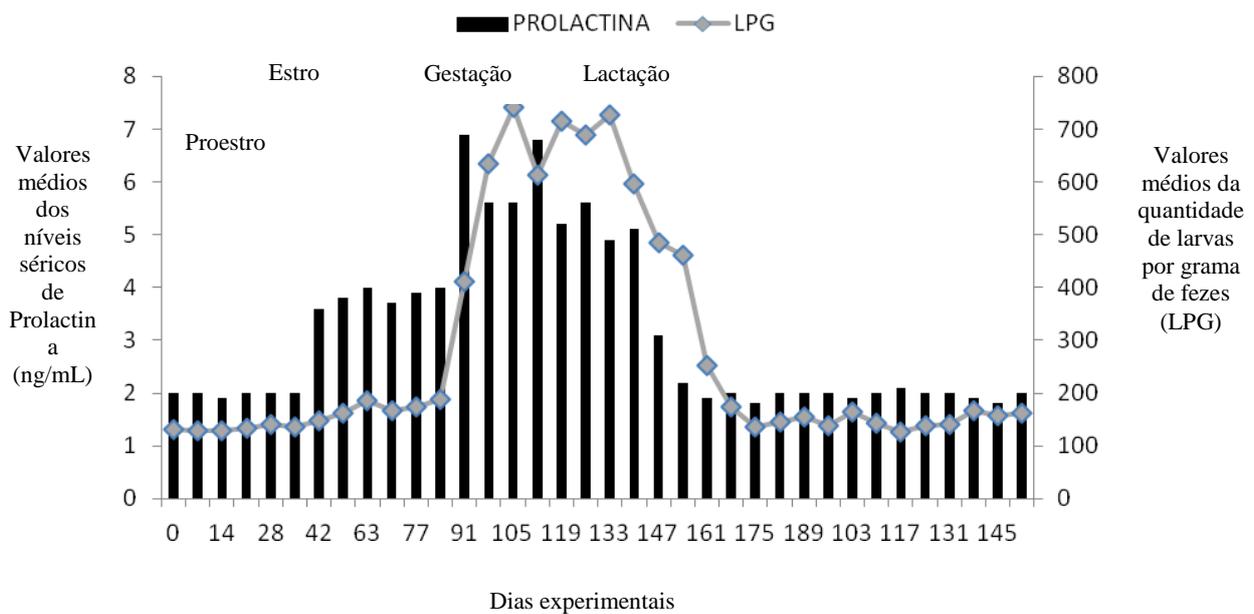


FIGURA 11: Número de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* ao longo das fases de proestro, estro, período gestacional e período de lactação em cadelas infectadas e a dosagem média dos níveis de prolactina sérico.



## DISCUSSÃO:

Como pode ser observado nos resultados os anticorpos anti-*A. vasorum* foram passados aos filhotes e estes permaneceram na circulação da prole até 8º ou 9º semana de vida. O leite foi examinado aos 15 dias e não foram detectadas larvas de *A. vasorum*, mas houve detecção de anticorpo anti-*A. vasorum*. Experimentos com outros parasitos também mostram que não foram encontradas larvas no leite como no trabalho de Hayasaki (1982) com *Dirofilaria immitis*, mas a passagem de anticorpo ocorreu para os filhotes, sendo que as fêmeas com alta concentração de anticorpo, os seus filhotes também apresentaram altas doses e as que apresentavam baixa concentração do anticorpo, o mesmo ocorreu com seus filhotes. Santarém et al. (2014), ao realizar experimento com coelhos infectados experimentalmente com *Toxocara canis* observou a eliminação de larvas no 14º e 21º dia de lactação. O trabalho dos autores Abdel-Rahman e El-Ashmawy (2013) com bubalinos infectados naturalmente com *Toxocara vitulorum* foi verificado a presença de larvas no leite nos primeiros dias após o parto e o colostro apresentava alta concentração de anticorpo no primeiro dia após o parto e após 15 dias a concentração do antígeno diminuiu acentuadamente. Nos bezerros o nível de anticorpo apresentava alta concentração durante a primeira semana e o nível se manteve até seis semanas, após a 20ª semana a taxa do anticorpo chegou ao menor nível. Esse declínio da concentração de anticorpo também foi verificado na prole das cadelas com angiostrongilose sendo que aos 90 dias a maioria dos filhotes já não apresentavam anticorpos anti- *A. vasorum* circulantes.

As ninhadas maiores tiveram diferença nas dosagens individuais de anticorpos em cada filhote o que pode ser reflexo do tempo e quantidade de leite ingerido. Segundo Biazzone et al. (2001) existe variação individual no grau de proteção, dependendo tanto da imunidade da cadela genitora quanto da quantidade de colostro ingerido pelo filhote.

A cadela que teve apenas um filhote e, portanto, este não sofreu a disputa alimentar, os anticorpos permaneceram por um maior tempo na circulação o que pode ser associado a completa ingestão do colostro. Fato que corrobora com estudo de Hayasaki (1982) que comprova que o anticorpo anti- *Dirofilaria immitis* é transferido pelo colostro de cadelas com dirofilariose aos filhotes e esse anticorpo circula nos filhotes por um período de 2 meses.

A dinâmica de eliminação larvária não apresentou alterações quando relacionadas as mudanças hormonais provocadas pela progesterona e pelo LH na cadela durante as fases reprodutivas. Entretanto, o aumento de prolactina coincidiu com o aumento da eliminação larvária nas fezes. Estudos realizados em outros animais (Chartier et al. 1988, Mandonnet et al. 2005) mostram uma correlação com o aumento da eliminação de parasitos em períodos de alteração fisiológica como no período que antecede o parto e no período de lactação, que são períodos que existem maior dosagem de prolactina. Não existem estudos relacionando a variação hormonal em cadelas com a dinâmica de parasitos, sendo necessário mais estudos para identificar outros fatores que possam estar envolvidos nesse processo.

### **CONCLUSÕES:**

Os resultados deste estudo mostram que existe transferência de anticorpos de forma passiva em filhotes de genitoras infectadas com *A. vasorum* e que estes persistem na circulação dos filhotes por aproximadamente 60 dias. Além disso, existe transferência destes anticorpos via mamária. A eliminação larvária ocorre durante todas as fases reprodutivas da cadela e percebe-se um aumento do número de L1 eliminadas nas fezes a partir da segunda metade do período gestacional e durante o período de lactação coincidindo com o aumento de prolactina que ocorre nesse período.

### **REFERÊNCIAS:**

Abdel-Rahman MAM , El-Ashmawy WR 2013. *Toxocara vitulorum* in Faeces, Serum and Milk of Buffaloes in Giza Governorate. *Int. J. Livest. Res.* 3(2): 89-99.

Azevedo SS, Batista CS, Vasconcellos SA, Aguiar DM, Ragozo AM, Rodrigues AA, Alves CJ, Gennari SM 2005. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Res Vet Sci.* 79(1):51-6.

Barreto CS, Prestes NC 2004. Imunidade e nutrição neonatal canina. *Rev Cient Med Vet* 2(5):57-60.

Biazzono L, Hagiwara MK, Correa AR 2001. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 38: 245-250.

Blunden TS. 2000. Neonato: defectos congênitos y mortalidad neonatal. In: England GCW, Simpson GM, Harvey MJ. (Ed.). Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales. Barcelona: Romanyà/Valls. p.193-208.

Brambell FWR 1958. The passive immunity of the young mammal. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 33: 488-531.

Butler JE, Kehrli ME Jr 2005. Immunoglobulins and immunocytes in the mammary gland and its secretions. In *Mucosal Immunology*, 3rd ed.; Mestecky, J., Lamm, M., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R., Mayer, L., Eds.; Elsevier Academic Press: Burlington, MA, USA. Volume 2, pp. 1764–1793.

Chapman P S, Boag AK, Guitian J, Boswood A 2004. *Angiostrongylus vasorum* infection in 23 dogs (1999-2002). *Journal of Small Animal Practice* 45: 435-440.

Chartier C, Hoste H, Bouquet W, Malpaux B, Pors I, Koch C. 1998. Periparturient rise in fecal egg counts associated with prolactin concentration increase in French Alpine dairy goats. *Parasitol Res* 84: 806-810.

Garosi LS, Platt SR, McConnell J, Wray JD, Smith KC 2005. Intracranial haemorrhage associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in three dogs. *Journal of Small Animal Practice* 46: 93-99.

Goździk K, Wrzesień R, Wielgosz-Ostolska A, Bień J, Kozak-Ljunggren M, Cabaj W 2011. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dogs from urban areas in Central Poland. *Parasitol Res.* 108(4): 991–996.

Hayasaki M, 1982. Passive transfer of anti- *Dirofilaria immitis* hemagglutinating antibody from the mother dog to its offspring. *Jpn. J. Vet. Sci* 44: 781-786.

Henson K L 2003. Sistema reprodutor. In: Raskin RE, Meyer DJ. *Atlas de citologia de cães e gatos*. São Paulo: Roca, p.233-263.

Hosseininejad M, Malmasi A, Hosseini F, Selk-Ghaffari M, Khorrami N, Mohebbali M, Shojaee S, Mirani A, Azizzadeh M, Mirshokraei P, Aliari A 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Dogs in Tehran, Ira. *Iran J Parasitol*. 6(1): 81–85.

Hurley WL 2003. Immunoglobulins of the mammary secretions. In *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, 3rd ed.; Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, NY, USA. Volume 1, Part A, pp. 421–447.

Kaufmann P, Burton G 1994. Anatomy and genesis of the placenta. In: Knobil E, Neill JD. *The physiology of reproduction*. 2.ed. New York: Raven Press. v.1, p.441-484.

Klewer AM, Forbes A, Schnieder T, Strube C 2012. A survey on *Dictyocaulus viviparus* antibodies in bulk milk of dairy herds in Northern Germany. *Preventive Veterinary Medicine* 103:243– 245.

Mandonnet N, Bachand M, Mahieu M, Arquet R, Baudron F, Abinne-Molza L, Varo H, Aumont G 2005. Impact on productivity of peri-parturient rise in fecal egg counts in Creole goats in the humid tropics. *Veterinary Parasitology* 134: 249–259.

Mozzer LR, Lima WS 2012. Rupture of the thoracic aorta associated with experimental *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog. *Parasite* 19:189-191.

Mozzer LR, Montresor LC, Vidigal TH, Lima WS 2011. *Angiostrongylus vasorum*: Experimental Infection and Larval Development in *Omalonyx matheroni*. *Journal of Parasitology Research*. 2011: 1-4.

Santarém VA, Exposto CFS, Ramires LM, Bin LLC, Rubinsky-Elefant G, Laposy CB, Nogueira RMB 2014. Detection of larvae of *Toxocara canis* in milk: an experimental study in rabbits. *Semina: Ciências agrárias* 35(1): 357-364.

Wessmann A, Lu D, Lamb CR, Smyth B, Mantis P, Chandler K, Boag A, Cherubini GB, Cappello R 2006. Brain and spinal cord haemorrhages associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in four dogs. *Veterinary Record* 158: 858-863.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- As larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* persistem por maior tempo em temperaturas mais frias o que poderia ser um dos fatores que justificaria a maior frequência de casos da doença em países de clima mais frio.
- Existe uma grande inespecificidade em relação ao hospedeiro intermediário para a angiostrongilose o que facilitaria a dispersão do parasito. Além disso, o parasitismo no hospedeiro intermediário leva a alterações na biologia do mesmo, entretanto, estas alterações não impedem que os moluscos continuem a se propagar definindo uma relação parasito hospedeiro constante.
- A descoberta de *Gallus gallus* como hospedeiro paratênico abre um importante caminho dentro do processo epidemiológico. A forma como a infecção ocorre nos canídeos pode se justificar pela predação destes animais e abre questionamentos sobre a presença e persistência de larvas em outros tipos de aves o que aumentaria ainda mais a capacidade de expansão do parasitismo.
- Existe transferência de anticorpos anti - *A. vasorum* de forma passiva e estes persistem na circulação dos filhotes por aproximadamente 60 dias. Os decréscimos desses anticorpos indicam que os filhotes podem se infectar logo após o desmame, fase que se inicia a predação. A eliminação larvária ocorre durante todas as fases reprodutivas da cadela e percebe-se um aumento do número de L1 eliminadas nas fezes a partir da segunda metade do período gestacional e durante o período de lactação coincidindo com o aumento de prolactina que ocorre nesse período.