

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANGIOSTRONGILOSE EM *Cerdocyon thous* (GRAXAIM-DO-MATO) E *Lycalopex
gymnocercus* (GRAXAIM-DO-CAMPO) NA REGIÃO SUL DO BRASIL

RAFAELA ALBUQUERQUE CAPRIOLI

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANGIOSTRONGILOSE EM *Cerdocyon thous* (GRAXAIM-DO-MATO) E *Lycalopex
gymnocercus* (GRAXAIM-DO-CAMPO) NA REGIÃO SUL DO BRASIL

RAFAELA ALBUQUERQUE CAPRIOLI

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção de grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na área de
concentração em Patologia Animal e
Patologia Clínica, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Sonne

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Caprioli, Rafaela Albuquerque
Angiostrongilose em *Cerdocyon thous* (graxaim-do-mato) e *Lycalopex gymnocercus* (graxaim-do-campo) na região sul do Brasil / Rafaela Albuquerque Caprioli.
-- 2018.
34 f.
Orientadora: Luciana Sonne.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Angiostrongilose. 2. Canídeos selvagens. 3. Aspectos anatomopatológicos. 4. Detecção molecular. I. Sonne, Luciana, orient. II. Título.

RAFAELA ALBUQUERQUE CAPRIOLI

ANGIOSTRONGILOSE EM *Cerdocyon thous* (GRAXAIM-DO-MATO) E *Lycalopex gymnocercus* (GRAXAIM-DO-CAMPO) NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Aprovado em 27 de abril de 2018.

APROVADO POR:

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Sonne
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini
Membro da Comissão

Prof. Dr. João Fábio Soares
Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luís Alexandre Caprioli e Adriane Albuquerque Caprioli, por todo apoio, dedicação e amor incondicional. Por fazer de tudo para que eu possa realizar meus sonhos. À minha família, por também estarem sempre ao meu lado. Ao meu namorado, João Augusto Rossi Borges, pela paciência e apoio em todos os momentos, e por me ajudar inclusive na parte escrita do artigo. Amo muito vocês.

À minha orientadora, Luciana Sonne, pela oportunidade e confiança a mim depositada, e a orientação e ensinamentos durante este ano. Também agradeço aos demais professores do Setor de Patologia da UFRGS, David Driemeier e Saulo Petinatti Pavarini, por estes anos de aprendizado no Setor.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para participar e contribuir neste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do SPV, Lauren, Fernando, Bárbara, Paulinha, Carol e Marcele pela ajuda e companheirismo do dia-a-dia do laboratório. Em especial, a Carol por ter me ajudado em toda a parte molecular do trabalho, obrigada pela paciência comigo.

Ao prof. João Fábio Soares na ajuda para a realização da análise filogenética.

Ao prof. Carlos Graeff-Teixeira e a prof^a. Alessandra Loureiro Morassutti por nos conceder os *primers* e a sonda para a realização do PCR.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Muito obrigada!

RESUMO

O gênero *Angiostrongylus* spp. pertence à família Metastrongyloidea, e possui até o momento 21 espécies diferentes. *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus vasorum* são nematoides que habitam as artérias pulmonares e ventrículo direito dos hospedeiros definitivos. Respectivamente, roedores e carnívoros são os hospedeiros definitivos e caramujos, lesmas e sapos são hospedeiros intermediários. Este estudo foi realizado para descrever as lesões macroscópicas e microscópicas, além identificar as espécies de *Angiostrongylus* spp. que infectam os carnívoros selvagens do sul do Brasil. No período de janeiro de 2013 a dezembro de 2017 foram necropsiados 29 carnívoros selvagens, e destes, 16 eram parasitados por *Angiostrongylus* spp., no qual 15 eram *Cerdocyon thous* e um *Lycalopex gymnocercus*. Nos pulmões analisados haviam áreas multifocais de consolidação, de coloração vermelho escura, e em um caso haviam nódulos brancacentos e firmes distribuídos multifocalmente em todos os lobos pulmonares. Em um animal, foi possível observar no tálamo, área focalmente extensa de amolecimento (malacia) com hemorragia. Na histologia havia pneumonia ou broncopneumonia granulomatosa, com variável número de ovos e larvas (L1) em vasos, interstício, espaços alveolares e por vezes em brônquios e bronquíolos com distribuição multifocal, além de nematódeos adultos no interior de vasos. Na lesão encontrada no cérebro observou-se área focalmente extensa de malacia com células gitter, hemorragia, trombose e larva dispersa em meio à lesão. Sete amostras foram identificadas, através de técnicas moleculares, como *A. cantonensis* (PCR em tempo real para o gene ITS-1) e um foi identificado como *A. vasorum* (sequenciamento do gene 18S), todas em *C. thous*. A amostra positiva para *A. vasorum* apresentou 97% de similaridade com sequências depositadas no *GenBank*, o que pode ser uma nova espécie ou subespécie de *Angiostrongylus* sp., e sugerimos novos estudos. A infecção em *L. gymnocercus* por *Angiostrongylus* spp. foi confirmada pela visualização histológica.

Palavras chave: pneumonia verminótica, *Angiostrongylus* spp., canídeos selvagens, doença parasitária, histopatologia, detecção molecular.

ABSTRACT

Angiostrongylus spp. belongs to the Metastrongyloidea family, and has so far 21 different species. In definitive hosts, rodents and carnivores, the nematodes *Angiostrongylus cantonensis* and *Angiostrongylus vasorum* inhabit the pulmonary arteries and right ventricle. Respectively, rodents and carnivores are the definitive hosts and snails, slugs and frogs are intermediate hosts. The objective of this study was to characterize the macroscopic and microscopic lesions, in addition to identifying the species of *Angiostrongylus* spp. which infect the wild carnivores of southern Brazil. From January 2013 to December 2017, 29 wild carnivores were necropsied, of which 16 were parasitized by *Angiostrongylus* spp., 15 *C. thous* and one *L. gymnocercus*. Were observed multifocal areas of consolidation, dark red in color, and in one case there were firm, white nodules distributed multifocally in all lung lobes of the analyzed lungs. In one animal was observe a focal extensive hemorrhagic softening area of the thalamus. Histologically there were granulomatous pneumonia or bronchopneumonia, with variable numbers of eggs and larvae (L1) in vessels, interstitium, alveolar spaces and sometimes in bronchi and bronchioles, with multifocal distribution. The adult nematodes were observed within vessels. The encephalus lesion was characterized by a focal extensive area of hemorrhagic malacia, thrombosis and dispersed larvae. Seven samples were identified using molecular techniques as *A. cantonensis* (real-time PCR for the ITS-1 gene) and one was identified as *A. vasorum* (18S gene sequencing), all infecting *C. thous*. The positive sample for *A. vasorum* showed 97% similarity with sequences deposited in *GenBank*, suggesting a new species or subspecies of *Angiostrongylus* sp., and we suggest new studies. Infection in *L. gymnocercus* by *Angiostrongylus* spp. was confirmed by histological visualization.

Key words: verminous pneumonia, *Angiostrongylus* spp., wild canids, parasitic disease, histopathology, molecular detection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. REVISÃO DE LITERATURA	09
2.1 Angiostrongilose em humanos e carnívoros selvagens	09
2.2 <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	10
2.3 <i>Angiostrongylus vasorum</i>	11
3. ARTIGO	13
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

Angiostrongilose é uma doença parasitária emergente que acomete animais domésticos, selvagens e seres humanos (WANG *et al.*, 2008). *Angiostrongylus* spp. é um nematódeo, da superfamília Metastrongyloidea, e possui até o momento 21 espécies diferentes em todo o mundo (PROCIV; SPRATT; CARLISLE, 2000; THIENGO *et al.*, 2013; ROBLES *et al.*, 2016). Carnívoros e roedores são os principais hospedeiros definitivos e moluscos são hospedeiros intermediários (ACHA; SZYFRES, 2003). Seis espécies foram descritas infectando carnívoros: *Angiostrongylus vasorum*, *A. raillieti*, *A. gubernaculatus*, *A. chabaudi*, *A. daskalovi* e *A. felineus* e o restante roedores: *A. tateronae*, *A. cantonensis*, *A. sciuri*, *A. mackerrasae*, *A. sandarsae*, *A. petrovi*, *A. dujardini*, *A. schmidti*, *A. costaricensis*, *A. malaysiensis*, *A. ryjikovi*, *A. andersoni*, *A. siamensis*, *A. morerai*, e *A. lenzii*. Todas as espécies habitam as artérias pulmonares e ventrículo direito, com exceção de *A. costaricensis* e *A. siamensis*, que habitam as artérias mesentéricas do ceco (THIENGO *et al.*, 2013; ROBLES *et al.*, 2016).

No ciclo de vida de todas as espécies, as larvas de primeiro estágio (L1) são liberadas nas fezes do hospedeiro, das quais utilizam lesmas e/ou caracóis aquáticos ou terrestres como hospedeiro intermediário, onde se transformam até larvas de terceiro estágio (L3) (SPRATT 2015). A transmissão do hospedeiro ocorre pela ingestão de moluscos infectados pelas L3 ou por hospedeiros paratêmicos também infectados, que incluem: rãs, peixes, caranguejos, camarões e lagartos (TSAI *et al.*, 2011).

Este trabalho teve por objetivo descrever casos de angiostrongilose em *Cerdocyon thous* (graxaim-do-mato) e *Lycalopex gymnocercus* (graxaim-do-campo) na região sul do Brasil, além de caracterizar os aspectos macroscópicos e microscópicos da infecção e identificar as espécies de *Angiostrongylus* spp. através de ferramentas moleculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Angiostrongilose em humanos e carnívoros selvagens

De todas as espécies de *Angiostrongylus* distribuídas mundialmente, apenas duas, *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, causam infecções em seres humanos, e estes se infectam através da ingestão de alimentos crus ou com baixo tempo de cocção, como caramujos, lesmas, camarões, caranguejos, rãs e lagartos, ou ainda, saladas, ervas e sucos de frutas que estejam contaminados com larvas L3. Acidentalmente, durante a manipulação de jardins, também pode haver a infecção (MORASSUTTI *et al.*, 2014). *A. costaricensis*, habitam as artérias mesentéricas do ceco, e causam angiostrongilose abdominal, problema especialmente encontrado na América do Sul e Central (MALDONADO; SIMÕES; THIENGO, 2012). *A. cantonensis*, causa neuroangiostrongilose, está se espalhando rapidamente e é encontrado em várias ilhas do Pacífico, Ásia, Austrália, África, algumas ilhas no Caribe e nas Américas (COWIE, 2013; MORASSUTTI *et al.*, 2014). *Achatina fulica*, é considerado um dos principais hospedeiros intermediários da angiostrongilose, porém muitas espécies de moluscos também são consideradas hospedeiros intermediários de *Angiostrongylus* spp., como *Bradybaena similares*, *Subulina octona*, *Pomacea canaliculata*, *Pomacea lineata*, entre outros (CALDEIRA *et al.*, 2007; THIENGO *et al.*, 2010).

Neuroangiostrongilose humana é uma doença aguda, rara, pode ser assintomática e muitas vezes pode ter a resolução dos sintomas em poucas semanas (GRAEFF-TEIXEIRA; SILVA; YOSHIMURA, 2009). Raramente está associada a sequelas graves, que podem surgir em decorrência dos efeitos dos granulomas ou dos abscessos formados ao redor das larvas mortas no parênquima neural (LI *et al.*, 2001). Em 3% dos casos, a doença pode ser fatal, em decorrência de encefalite com graves sinais neurológicos. Mortalidades ocorrem principalmente em crianças, porém a morte em adultos pode ocorrer quando há exposição maciça a larvas infectantes (LI *et al.*, 2001; EAMSOBHANA; YONG, 2009).

A primeira descrição de angiostrongilose no Brasil em canídeos selvagens ocorreu no estado do Rio de Janeiro em *C. thous* por *A. vasorum* (TRAVASSOS, 1927). Em seguida mais infecções foram registradas, em *Lycalopex vetulus* em Minas Gerais (LIMA; GUIMARÃES; LEMOS, 1994) e em *C. thous* em Minas Gerais (DUARTE *et al.*, 2007;

VIEIRA *et al.*, 2017) e Distrito Federal (FERREIRA-JÚNIOR *et al.*, 2017), todos causados por *A. vasorum*. Até o momento, infecção por *A. cantonensis* em *C.thous* e *L. gymnocercus* no Brasil não foi registrada.

2.2 *Angiostrongylus cantonensis*

A. cantonensis é um nematódeo presente nas artérias pulmonares e ventrículo direito de ratos, principalmente, *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*, seu principal hospedeiro definitivo. Humanos, cães, cavalos, aves, entre outros animais selvagens são considerados hospedeiros acidentais (LUNN *et al.*, 2012). A infecção por *A. cantonensis* foi descrita pela primeira vez na China infectando roedores. Este nematoide está disperso em várias ilhas do Pacífico, Ásia, Austrália, África, algumas ilhas no Caribe e nas Américas (MORASSUTTI *et al.*, 2014).

Os parasitas adultos são encontrados no coração e nas artérias pulmonares dos hospedeiros definitivos. As fêmeas liberam ovos que são transportados para capilares pulmonares, onde eclodem larvas de primeiro estágio (L1), que penetram através das paredes capilares e alveolares para os alvéolos. Estas larvas são então tossidas e engolidas pelo hospedeiro infectado, e saem nas fezes do mesmo. Lesma, caramujo e sapo são hospedeiros intermediários e se infectam através da ingestão de L1 presentes nas fezes. Dentro destes hospedeiros intermediários, L1 se desenvolve até a larva de terceiro estágio (L3). A infecção dos hospedeiros definitivos ou acidentais acontece pela ingestão destes hospedeiros intermediários que contém L3 (MARTINS; TANOWITZ; KAZACOS, 2015). Nestes hospedeiros, L3 penetram nas paredes do trato gastrointestinal, entram na corrente sanguínea, da qual passam pelo fígado e veia cava inferior e atingem a circulação pulmonar pelo ventrículo direito. As larvas então passam pelos capilares pulmonares e chegam ao coração esquerdo, sendo dispersas pela circulação arterial, atingindo o cérebro. Uma vez no cérebro as larvas se desenvolvem até larvas de quinto estágio (L5), do qual posteriormente migram para o coração pelo sistema venoso e habitam as artérias pulmonares, do qual amadurecem e se transformam em nematódeos adultos, reiniciando o ciclo (MARTINS; TANOWITZ; KAZACOS, 2015). Em humanos, *A. cantonensis* são incapazes de voltar ao sistema circulatório e morrem no cérebro (COWIE 2013), portanto os nematódeos adultos não são observados nas artérias pulmonares de seres humanos (MORASSUTTI *et al.* 2014).

Em estudo realizado com 22 cães com angiostrongilose neural no leste da Austrália, todos os animais apresentaram paresia bilateral dos membros posteriores, atrofia muscular dos mesmos, incontinência urinária e hiperestesia da região lombar e da cauda (LUNN *et al.*, 2012). Menos comumente, foi observado também sinais gastrointestinais como vômito e diarreia, e déficits neurológicos que incluíram paralisia de nervo craniano, incontinência fecal, convulsão ou coma (LUNN *et al.*, 2012).

2.3 *Angiostrongylus vasorum*

Angiostrongylus vasorum é um nematoide amplamente distribuído na Europa, África, América do Norte e do Sul (TAYLOR *et al.*, 2015). Canídeos domésticos e selvagens que incluem raposas, lobos, coiotes e chacais são considerados hospedeiros definitivos, e moluscos são considerados hospedeiros intermediários. *A. vasorum* é encontrado nas artérias pulmonares e ventrículo direito (BOLT *et al.*, 1994; KOCH; WILLESEN, 2009). Este nematoide foi descrito pela primeira vez em raposas na Itália (POLI *et al.*, 1984).

Assim como no ciclo de *A. cantonensis*, as L1 são liberadas nas fezes dos hospedeiros definitivos. No meio ambiente, moluscos se infectam pela ingestão de L1, que dentro destes se transformam até L3. A infecção dos hospedeiros definitivos acontece pela ingestão destes hospedeiros intermediários que contém L3. Estas, por sua vez, penetram nas paredes do trato gastrointestinal e, se desenvolvem até L5 após a invasão dos linfonodos viscerais do abdômen. As larvas L5 migram através do fígado e veia cava para o lado direito do coração e artérias pulmonares, amadurecem e se transformam em nematódeos adultos, reiniciando o ciclo (BOLT *et al.*, 1993; BOLT *et al.*, 1994).

A infecção por *A. vasorum* é bem descrita em canídeos domésticos e pode causar uma grande variedade de manifestações clínicas, que variam de alterações leves a graves. Estas alterações incluem tosse, dispneia, intolerância ao exercício, perda de peso, taquicardia, anemia, diátese hemorrágica, tempo de coagulação prolongado e coagulação intravascular disseminada (BOLT *et al.*, 1994; JEFFERY *et al.*, 2004; KOCH; WILLESEN, 2009). Nos canídeos selvagens, os sinais clínicos normalmente são mais leves, e sugere-se que estes animais selvagens sejam mais adaptados. Lesões graves no parênquima pulmonar são observadas somente quando existe um alto parasitismo ou quando há alguma doença concomitante. O curso da doença em canídeos selvagens é

crônico, e estes animais podem eliminar as larvas no ambiente durante toda a sua vida (SANTORO *et al.*, 2015). Pelo alto grau de adaptação, canídeos selvagens tendem a ser mais frequentemente parasitado por *A. vasorum* do que o cão doméstico, e podem ser considerados reservatórios para os mesmos (MORGAN *et al.*, 2005).

3 ARTIGO

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “Angiostrongilose em *Cerdocyon thous* (graxaim-do-mato) e *Lycalopex gymnocercus* (graxaim-do-campo) na região sul do Brasil”, o qual foi redigido segundo as normas do periódico *Parasitology Research* para ser submetido após as correções da banca.

Angiostrongilose em *Cerdocyon thous* (graxaim-do-mato) e *Lycalopex gymnocercus* (graxaim-do-campo) na região sul do Brasil

Rafaela Albuquerque Caprioli¹, Caroline Pinto de Andrade¹, Fernando Froner Argenta¹, Luiza Presser Ehlers¹, João Fábio Soares², Saulo Petinatti Pavarini¹, David Driemeier¹, Luciana Sonne¹

Resumo

Angiostrongilose é uma doença parasitária que acomete animais domésticos, selvagens e seres humanos. *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus vasorum* são espécies que habitam artérias pulmonares e ventrículo direito dos hospedeiros definitivos. Respectivamente, roedores e carnívoros são os hospedeiros definitivos, e moluscos servem de hospedeiros intermediários. Este estudo foi realizado para identificar as espécies de *Angiostrongylus* spp. que infectam carnívoros selvagens do sul do Brasil e descrever as lesões macroscópicas e microscópicas causadas pelo mesmo. No período de janeiro de 2013 a dezembro de 2017 foram realizadas necropsias de 29 carnívoros selvagens, e destes, 16 estavam parasitados por *Angiostrongylus* spp., no qual 15 eram *Cerdocyon thous* e um *Lycalopex gymnocercus*. Nos pulmões analisados haviam áreas multifocais de consolidação, de coloração vermelho escura, e em um caso haviam nódulos brancacentos e firmes distribuídos multifocalmente em todos os lobos pulmonares. Em um animal, foi possível observar no cérebro, área focalmente extensa de amolecimento (malacia) associado à hemorragia. Na histologia, havia pneumonia ou broncopneumonia granulomatosa, com ovos e larvas (L1) em vasos, interstício, espaços alveolares e por vezes em brônquios e bronquíolos com distribuição multifocal, além de nematódeos adultos no interior de vasos. Na lesão encontrada no cérebro observou-se área focalmente extensa de malacia com células gitter, hemorragia, trombose e larva dispersa em meio à lesão. Foi possível identificar, através de técnicas moleculares, sete amostras positivas para *A. cantonensis* (PCR em tempo real para o gene ITS-1), incluindo a amostra de cérebro, e uma amostra positiva para *A. vasorum* (sequenciamento do gene 18S), todas em *C. thous*. A amostra positiva para *A. vasorum* apresentou 97% de similaridade com sequências depositadas no *GenBank*, o que sugere uma nova espécie ou subespécie de *Angiostrongylus* sp., do qual sugerimos novos estudos. A infecção em *L. gymnocercus* por *Angiostrongylus* spp. foi confirmada pela visualização histológica.

¹ Setor de Patologia Veterinária (SPV), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Prédio 42505, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.

² Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Palavras-chave: pneumonia verminótica, *Angiostrongylus* spp., aspectos anatomopatológicos, detecção molecular.

INTRODUÇÃO

Angiostrongylus spp. é um nematódeo, da superfamília Metastrongyloidea, e possui 21 espécies diferentes em todo o mundo (Prociv et al. 2000; Thiengo et al. 2013; Robles et al. 2016). Carnívoros e roedores são os principais hospedeiros definitivos e moluscos são os hospedeiros intermediários (Acha e Szyfres 2003). Todas as espécies se encontram nas artérias pulmonares e no ventrículo direito, com exceção de *A. costaricensis* e *A. siamensis*, que habitam as artérias mesentéricas do ceco (Robles et al. 2016). Normalmente, *A. vasorum* tem como hospedeiro definitivo os carnívoros, e *A. cantonensis*, os roedores. Humanos, cães, cavalos, aves, entre outros animais selvagens são considerados hospedeiros acidentais da infecção por *A. cantonensis* (Lunn et al. 2012).

A capacidade destes parasitas de se desenvolver em novas áreas se deve em parte, a ampla variedade de hospedeiros definitivos e acidentais (Koch e Willeesen 2009). Por exemplo, *A. cantonensis* já foi diagnosticada através de exame histológico em gambá-da-virgínia (*Didelphis virginiana*), raposa voadora de cabeça cinza (*Pteropus poliocephalus*), lemur preto e branco (*Varecia variegata*) e cavalo miniatura (*Equus ferus caballus*) (Reddacliff et al. 1999; Costa et al. 2000; Kim et al. 2002) e por exame de ELISA e *Western blot* em caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) (Lunn et al. 2012). Já a infecção natural por *A. vasorum* foi diagnosticada, através de exame coproparasitológico em felino doméstico (*Felis domesticus*) e texugo-europeu (*Meles meles*) (Kamenov et al. 1999; Torres et al. 2004), microscopia eletrônica em lobo (*Canis lupus*) e graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) (Segovia et al. 2001; Duarte et al. 2007; Vieira et al. 2017) e por exame histológico em lobo (*Canis lupus*), pequenos mustelídeos (*Mustela erminea*, *Mustela nivalis*, *Mustela putorius*), canino doméstico (*Canis lupus familiaris*), raposa (*Vulpes vulpes*) e graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) (Denk et al. 2009; Eleni et al. 2014; Santoro et al. 2015; Simpson et al. 2016; Ferreira-Júnior et al. 2017). Além disso, esta ampla variedade de hospedeiros definitivos e acidentais pode representar uma ameaça à saúde humana, pois cães e espécies selvagens são importantes sentinelas para angiostrongilose humana e, portanto, são considerados uma ameaça para seres humanos que vivem em regiões onde estas espécies são acometidas (Ma et al. 2013). Em seres humanos, a infecção por este nematoide é considerada uma doença aguda, pode ser assintomática e em inúmeros casos

pode ter a resolução espontânea, principalmente em adultos (Graeff-Teixeira et al. 2009). A mortalidade é rara e acontece em aproximadamente 3% dos casos, especialmente em crianças, em que ocorrem encefalites com graves sinais neurológicos (Li et al. 2001; Eamsobhana e Yong 2009).

Este trabalho tem por objetivo descrever casos de angiostrongilose em *Cerdocyon thous* (graxaim-do-mato) e *Lycalopex gymnocercus* (graxaim-do-campo) na região sul do Brasil, além de caracterizar os aspectos macroscópicos e microscópicos da infecção e identificar as espécies de *Angiostrongylus* spp. através de ferramentas moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo e prospectivo, através de registros de necropsias no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2017 e foram selecionados os casos de canídeos selvagens. Os animais eram encaminhados ao setor de patologia por médicos veterinários de centros de vigilância em saúde, universidades e zoológicos. Eram oriundos de cidades como Viamão, Canoas, Mostardas, Estrela e Cruz Alta, porém a localização de alguns dos animais, não foram precisas, pois estes foram encontrados na estrada nos arredores da grande região metropolitana de Porto Alegre. Os dados de identificação do animal, assim como as lesões macroscópicas e microscópicas e o diagnóstico descrito nas requisições de necropsia foram revisados e compilados. Para incluir os casos do presente estudo o critério utilizado foi a presença de ovos, larvas e nematódeos adultos compatíveis com *Angiostrongylus* sp. na visualização pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e/ou a confirmação por PCR.

Em duas necropsias foi possível a realização de *imprint* de pulmão, do qual foi corado com corantes do tipo *Romanowsky (Diff-Quik®)*. Amostras teciduais coletadas durante a necropsia, foram fixadas em solução de formalina 10%, sendo realizados procedimentos rotineiros de histologia e após coradas pela técnica de HE. Adicionalmente foi realizado a técnica histoquímica de Tricrômico de Masson em cortes de pulmão para a identificação da proliferação de tecido conjuntivo fibroso. Além disso, secções de pulmão foram submetidos a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-actina de músculo liso (*Dako®*, clone 1A4) para a identificação de hipertrofia e hiperplasia de musculatura lisa alveolar e de arteríolas. A IHQ foi realizada pelo método de polímero (*MACH4*), recuperação antigênica com tampão de EDTA pH 9,0 em panela de pressão a vapor (120°C, 20'), com anticorpo anti-actina de músculo liso (1:100) e com o cromógeno AEC (aminoetilcarbazol).

Todos os casos de necropsia foram submetidos ao exame complementar pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com amostras de pulmão e em um caso com amostra de sistema nervoso central (SNC), em que oito eram amostras teciduais frescas e 21 em blocos de parafina. Primeiramente foi extraído o DNA total das amostras, de acordo com as instruções do fabricante (*Qiagen*). Após a extração as amostras foram submetidas à PCR para o gene 18S RNA ribossomal de *Angiostrongylus* spp. (SSU F: 5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3' e SSUR: 5'-AGCTGGAATTACCGCGGCTG-3'), de acordo com Blaxter et al. (1998) e Foronda et al. (2010), com a modificação da temperatura de anelamento do *primer* para 62°C. Os produtos de PCR (480 bp) foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2%. Para a confirmação do resultado, as amostras foram submetidas ao sequenciamento. Para tal, os produtos de PCR foram purificados (*Purelink kit*) e quantificados (*Qubit kit*). As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (*BigDye Terminator versão 3.1 Cycle Sequencing kit no ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*). O resultado dos cromatogramas foram analisados através do software *Staden package version 1.7.0* (Staden et al. 2003). As sequências obtidas foram submetidas à análise de *Blast* (Altschul et al. 1990) para verificação de similaridade com sequências no *GenBank* e confirmação da identidade do agente encontrado. Para análise filogenética a sequência obtida foi alinhada com outras sequências de *Metastrongilídeo* com auxílio do programa *Clustal / W v.1.8.1* (Thompson et al. 1994). Uma árvore filogenética de Máxima verossimilhança (*Maximum-likelihood*) foi desenvolvida usando como modelo de substituição Tamura-3 parâmetros + G (gama), utilizando-se o software *Mega 7*. (Tamura 1992), com 100 repetições de *bootstrap*. O modelo de substituição foi selecionado utilizando software *Mega 7* (Tamura 1992) de acordo com a menor pontuação do parâmetro BIC (*Bayesian Information Criterion*). A sequências do gênero *Dracunculus* foram utilizadas como grupo externo (*outgroup*).

Além do PCR convencional, as amostras de DNA foram submetidas à PCR em tempo real por sonda *Taqman* para o gene ITS-1 de *A. cantonensis*. Os *primers* e a sonda utilizados estão descritos no artigo de Qvarnstrom et al. (2010), com a modificação nas condições de amplificação: 94°C por 5min, seguidos de 50 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 minuto.

RESULTADOS

No período analisado foi realizada a necropsia de 29 carnívoros selvagens, destes, 16 (55%) apresentavam infecção por *Angiostrongylus* spp., dos quais 15 eram *C. thous* (93,75%) e um era *L. gymnocercus* (6,25%). Informações com relação a cada animal estão descritos na tabela 1. Em apenas um

caso foi possível observar somente pneumonia granulomatosa, em decorrência de angiostrongilose, sem nenhuma outra causa de morte evidente. No restante dos casos, a pneumonia verminosa foi associada com outras causas de morte, como traumatismo em decorrência de atropelamento em 11 casos (56,25%) e quatro casos de cinomose (25%), destes, um caso de cinomose foi acompanhado de rangeliose. Em um caso de traumatismo, além da pneumonia granulomatosa, o animal apresentava hemorragia e malacia no cérebro, porém as lesões traumáticas eram restritas ao membro posterior direito.

Macroscopicamente, em nove casos, os pulmões apresentavam-se não colabados, com áreas multifocais firmes à palpação, de coloração vermelho escura, possuíam a superfície brilhante (Fig.1A) e, ao corte por vezes fluía conteúdo líquido serossanguinolento. Em um caso observou-se pequenos nódulos brancos e firmes distribuídos multifocalmente em todos os lobos pulmonares (Fig.1B). Na avaliação macroscópica do cérebro observou-se, em um caso, área focalmente extensa de amolecimento com hemorragia envolvendo o tálamo, mesencéfalo e tronco encefálico, na altura de ponte (Fig.1C).

Nas áreas em que eram observadas lesões no parênquima pulmonar, na histologia havia broncopneumonia ou pneumonia intersticial granulomatosa com variável número de ovos e larvas (L1) em vasos, interstício, espaços alveolares (Fig.1D) e por vezes em brônquios e bronquíolos, com distribuição multifocal, além de nematódeos adultos no interior de vasos (Fig.1E). Os ovos tinham parede fina, eram ovoides (25-40 x 30-50 µm) e continham mórula (ovo morulado) ou larvas em formação no seu interior (ovo larvado). As larvas eram alongadas, com cutícula eosinofílica e continham grânulos basofílicos (7-11 x 20-45 µm). As larvas e ovos eram rodeados por proliferação de tecido conjuntivo fibroso, identificadas principalmente através da coloração por Tricrômio de Masson (Fig.2A), associado a infiltrado inflamatório composto de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, por vezes contendo grânulos acastanhado no seu interior, e ocasionais eosinófilos e células gigantes multinucleadas. As paredes das artérias pulmonares apresentavam-se espessadas devido à deposição de tecido conjuntivo fibroso (Fig.2B). Os nematódeos adultos encontrados no interior dos vasos mediam em corte transversal 220-230 x 250-420 µm e em corte longitudinal 190-250 x 530-840 µm, com cutícula eosinofílica, musculatura celomiariana/polimiariana e cavidade pseudocelomática, no qual era possível observar trato gastrointestinal e trato reprodutivo. Estes parasitas frequentemente eram cercados por trombos.

Adjacente aos granulomas ainda era possível observar hipertrofia de musculatura lisa alveolar (93,75%) e hiperplasia e hipertrofia de musculatura lisa de arteríolas (87,5%) (Fig.2C), ambos apresentaram forte imunomarcagem para a actina de músculo liso, além de hemorragia (75%) em espaços alveolares,

interstício e perivascular, trombose (62,5%), às vezes com recanalização (43,75%) e edema alveolar (43,75%). Em pleura, por vezes, havia discreto espessamento por proliferação de tecido conjuntivo (68,75%). Nas duas necropsias em que foi realizado *imprint* do tecido pulmonar, foi possível observar larvas (L1) em um caso (Fig.2D).

Na análise do cérebro observou-se, em um caso, área focalmente extensa de malacia, caracterizada por rarefação do neurópilo e presença de células gitter, além de hemorragia, trombose e larva dispersa em meio à lesão (Fig.1F). No restante dos cérebros analisados, haviam áreas multifocais de hemorragia em dez cérebros, que variavam de discretas a moderada, em neurópilo e ao redor de vasos sanguíneos.

Após a PCR convencional foi possível identificar o gene 18S de RNA ribossomal de *Angiostrongylus* spp., gerando um *amplicon* de 480 bp, em um *C. thous*. Através do sequenciamento e a análise pelo *Blast* verificou-se a similaridade (97%) da amostra com *A. vasorum*, que posteriormente será depositada no *GenBank*. Após a sua identificação por sequenciamento foi realizada a análise filogenética (Fig. 3), demonstrando relação filogenética próxima entre a sequência obtida e a espécie *A. vasorum*, quando comparado as outras espécies de *Angiostrongylus* spp. Já a análise molecular por PCR em tempo real (ITS-1) identificou sete amostras positivas para *A. cantonensis*, em *C. thous*, que incluiu o único caso em que foi observado lesão encefálica.

Dos oito casos positivos para *Angiostrongylus* spp. na PCR, em quatro casos, a confirmação se deu pelo HE e PCR, do restante obtivemos apenas a PCR positivo. Ainda, dos oito casos (seis de bloco de parafina e dois de material fresco) que foram negativos no PCR, incluímos no estudo devido a visualização microscópica dos parasitas.

DISCUSSÃO

Foi possível identificar que um grande número de canídeos selvagens pode estar infectado por *Angiostrongylus* spp. na região sul do Brasil, pois neste estudo 55% dos animais analisados foram parasitados por estes nematoides, em que *A. cantonensis* e *A. vasorum* foram os encontrados. No Brasil, infecção por *A. vasorum* em canídeos selvagens já foram relatadas em *Lycalopex vetulus* em Minas Gerais (Lima et al. 1994) e em *C. thous* no Rio de Janeiro (Travassos, 1927), Minas Gerais (Duarte et al. 2007; Vieira et al. 2017) e Distrito Federal (Ferreira-Júnior et al. 2017). Infecção por *A. cantonensis* em *C. thous* e *L. gymnocercus* no Brasil ainda não foi relatada.

Em estudos realizados na Europa, as raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), foram o principal hospedeiro de *A. vasorum*. Esses são capazes de suportar a infecção sem alta mortalidade, com boa adaptação. Em canídeos selvagens, a infecção é mais leve, e lesões graves no parênquima pulmonar acontecem somente quando há doença concomitante ou quando há abundante quantidade de parasitas pulmonares (Morgan et al. 2008). Em nosso estudo, quatro animais foram diagnosticados com cinomose, que podem ter conseqüentemente agravado o caso.

Os principais achados macroscópicos se restringem principalmente a lesões no sistema respiratório e cardiovascular (Poli et al. 1984; Morgan et al. 2008). Hipertrofia ventricular direita e diminuição do peso cardíaco com relação ao peso corporal são alterações observadas à necropsia (Poli et al. 1984; Jeffery et al. 2004; Morgan et al. 2008), porém neste estudo não foi observado tais alterações. No sistema respiratório as lesões observadas no pulmão foram semelhantes às descritas por outros autores (Poli et al. 1984; Jeffery et al. 2004; Denk et al. 2009; Kistler et al. 2014) e incluíram: pulmões não colabados, com áreas multifocais de coloração vermelhas, consolidadas, e com nódulos firmes encapsulados de coloração brancacenta.

Os achados microscópicos dos pulmões relatados na literatura são semelhantes aos descritos no estudo e consistem em áreas multifocais a coalescentes de focos granulomatosos no parênquima pulmonar, no qual ao centro é observado inúmeros ovos e larvas (L1) e periféricamente, é observado fibrose associado a infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e algumas células gigantes multinucleadas. Em artérias pulmonares podem se observar nematódeos adultos, ocasionalmente associado à trombose arterial. L1 frequentemente também são observadas no interior de brônquios e bronquíolos, associadas a detritos celulares (Poli et al. 1984; Eleni et al. 2014; Kistler et al. 2014; Santoro et al. 2015; Robles et al. 2016). Lesões vasculares podem ser observadas, como espessamento da parede das artérias pela intensa proliferação de tecido conjuntivo fibroso em reação a presença de nematódeos adultos no lúmen, que por vezes oclui a luz da artéria e ocasiona a trombose (Bourque et al. 2005).

Infiltrado inflamatório composto de eosinófilos são importantes na defesa contra doenças parasitárias, porém em nosso estudo, assim como na literatura, as lesões histopatológicas apresentam poucos ou nenhum componente eosinofílico, prevalecendo os componentes granulomatosos e crônicos (Traversa et al. 2008; Denk et al. 2009).

Na avaliação macroscópica e histopatológica do cérebro foi possível observar em um caso área focalmente extensa de hemorragia e malacia gerada pela infecção por *A. cantonensis* do qual era possível observar larva em meio à lesão e foi confirmado por PCR. No nosso estudo este animal era vítima de

atropelamento, porém, na necropsia, em decorrência de trauma por atropelamento, era possível observar apenas necrose do membro posterior direito, sem fraturas ou lesões no crânio, que pudesse gerar as lesões encefálicas de hemorragia e malacia. Lesão semelhante também já foi relatada na literatura em cavalo miniatura (*Equus ferus caballus*), gambá-da-virgínia (*Didelphis virginiana*) e lemur preto e branco (*Varecia variegata*) (Costa et al. 2000; Kim et al. 2002). Existem controvérsias entre os autores para a explicação das lesões no SNC. De acordo com Costa et al. (2000) estas lesões são causadas pelo dano mecânico feito pela migração parasitária. Porém, Mason et al. (1976) e McKenzie et al. (1978) sugerem que a lesão é causada principalmente pela resposta inflamatória granulomatosa direcionada ao parasita. No caso do nosso estudo, a melhor explicação seria em decorrência da migração causada pelo parasita, pois não foi observado resposta inflamatória na lesão encefálica.

Apesar de seu ciclo não incluir a migração para o SNC, *A. vasorum* também pode causar danos neurológicos através de hemorragias. Estas hemorragias já foram relatadas por diversos autores (Garosi et al. 2005; Wessmann et al. 2006; Denk et al. 2009) e provavelmente se deve a coagulopatia e não devido a presença da larva no SNC, como pode-se observar na infecção por *A. cantonensis* (Wessmann et al. 2006). No único caso positivo na PCR para *A. vasorum*, o animal teve como causa de morte politraumatismo, com múltiplas fraturas em regiões frontal, temporal e parietal do crânio, devido a atropelamento, o que conseqüentemente gerou as hemorragias. Em outros quatro casos de hemorragia no cérebro, os animais também foram vítimas de atropelamento e, portanto, a lesão pode ser devido ao traumatismo. Em um caso, havia cinomose associado a rangeliose, esta última pode gerar hemorragias no SNC. Do restante dos quatro casos com hemorragia, há possibilidade da lesão ser em decorrência da angiostrongilose.

A sequência do gene 18S de rRNA obtido de um *C. thous* com infecção por *A. vasorum* mostrou 97% de homologia com as sequências de *A. vasorum* depositadas no *GenBank*. Quando comparado as sequências do gene 18S de *A. vasorum* e *A. cantonensis*, depositadas no *GenBank*, observa-se uma similaridade de 99%, podendo sugerir que a amostra extraída de *C. thous* no sul do Brasil pertence a uma nova espécie ou subespécie de *A. vasorum*. Estudos anteriores, de evidências fósseis e análises genéticas, mostram que há divergências entre as espécies de raposas (*Vulpes* spp.) da Europa e os canídeos selvagens sul americanos, que inclui *C. thous* e *L. gymnocercus*, evidenciando uma evolução entre as espécies de canídeos juntamente com *A. vasorum* na América do Sul que difere dos nematódeos encontrados em outros países Europeus (Wang et al. 2004; Jefferies et al. 2009).

No presente estudo, dos 16 canídeos selvagens infectados pelo nematódeo apenas oito foram positivos pela técnica de PCR. Segundo Miething et al. (2006) fatores de pré-fixação (tipo e a quantidade do tecido, e o grau de autólise), fatores de fixação (pH, tempo de fixação e tipo de fixador) e fatores pós-fixação (tempo de armazenamento) podem levar a degradação dos ácidos nucleicos. Além disso, a pouca quantidade de DNA presente na amostra do presente estudo, tanto em material fresco como em parafina, pode acarretar em resultados negativos, pois como as lesões são multifocais há possibilidade da amostra não conter a quantidade de DNA do parasita necessária.

Em suma, nosso estudo identificou as lesões macroscópicas e microscópicas causadas pela infecção por *Angiostrongylus* spp., caracterizadas por pneumonia e broncopneumonia granulomatosas, além de lesão encefálica, no qual foram identificadas sete espécies *A. cantonensis* e uma de *A. vasorum* infectando *C. thous* na região sul do Brasil. *A. cantonensis* pode indicar um problema à saúde pública da população que está próxima a estas espécies, e nosso estudo, indica o primeiro registro deste nematódeo em canídeos selvagens do Brasil. A amostra positiva para *A. vasorum* identificada em *C. thous* pode ser uma nova espécie ou subespécie, devido ao grau de similaridade ser de 97% quando comparada com sequências de *A. vasorum* depositadas no *GenBank*, o que sugere novos estudos. A infecção em *L. gymnocercus* por *Angiostrongylus* spp. foi confirmada pela visualização de HE. Em nosso trabalho 55% dos canídeos selvagens estavam infectados por *Angiostrongylus* spp. causando broncopneumonia e pneumonia granulomatosa com grande quantidade de parasitas, do qual a maioria não foi relacionada a causa de morte dos animais.

Agradecimentos: Ao prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira e a prof^a. Dra. Alessandra Loureiro Morassutti, do Laboratório de Parasitologia Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por nos conceder os *primers* e a sonda para a realização do PCR em tempo real para o gene ITS-1.

REFERÊNCIAS

- Acha P, Szyfres B (2003) Zoonoses and communicable diseases man and animals, 3rd ed., Pan American Health Organization, Scientific and Tech Publications, Washington DC, 404 pp.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.

- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392:71–75.
- Bourque A, Whitney H, Conboy G (2005) *Angiostrongylus vasorum* infection in coyote (*Canis latrans*) from Newfoundland and Labrador, Canada. *J Wildl Dis* 41(4):816-819. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.4.816>
- Costa LRR, McCluret JJ, Snideirii G, Stewart TB (2000) Verminous meningoencephalomyelitis by *Angiostrongylus* (= *Parastrongylus*) *cantonensis* in an American Miniature Horse. *Equine vet Educ* 12(1):2-6.
- Denk D, Matiassek K, Just FT, Hermanns W, Baiker K, Herbach N, Steinberg T, Fischer A (2009) Disseminated angiostrongylosis with fatal cerebral haemorrhages in two dogs in Germany: A clinical case study. *Vet Parasitol* 160:100-108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.077>
- Duarte FH, Vieira FM, Louzada GL, Bessa ECA, Souzalima S (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(4):1086-1088.
- Eleni C, De Liberato C, Azam D, Morgan ER, Traversa D (2014) *Angiostrongylus vasorum* in wolves in Italy. *Int J for Parasitol Parasites and Wildl* 3:12-14.
- Eamsobhana P, Yong HS (2009) Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: *Angiostrongylidae*). *Int J Infect Dis* 13:425-431. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.09.021>
- Ferreira-Júnior JA, Blume GR, Sousa SKH, Carvalho CM, Gardiner C. (2017) Anatomopathological aspects of parasitism by nematodes of the superfamily Metastrongyloidea in wild crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Midwestern Brazil. *Ciencia Rural* 47(2):1-4.
- Foronda P, Lopez-Gonzalez M, Miquel J, Torres J, Segovia M, Abreu-Acosta N, Casanova JC, Valladares B, Mas-Coma S, Bargues MD, Feliu C (2010) Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain). *Acta Tropica* 114:123–127.
- Garosi LS, Platt SR, McConnell JF, Wray JD, Smith KC (2005) Intracranial haemorrhage associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in three dogs. *J Small Anim Pract* 46:93-99. <http://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2005.tb00300.x>

- Graeff-Teixeira C, da Silva AC, Yoshimura K (2009) Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clin Microbiol Rev* 22:322-348. <http://doi.org/10.1128/CMR.00044-08>
- Jefferies R, Shaw SE, Viney ME, Morgan ER (2009) *Angiostrongylus vasorum* from South America and Europe represent distinct lineages. *Parasitol* 136:107-115.
- Jeffery RA, Lankester MW, McGrath MJ, Whitney HG (2004) *Angiostrongylus vasorum* and *Crenosoma vulpis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Newfoundland, Canada. *Can J Zool* 82:66-74. <http://doi.org/10.1139/Z03-211>
- Kamenov Y, Radev V, Slateva N (1999) On diagnosis and clinic of angiostrongylosis of cats. *Exp Pathol Parasitol* 2:51-54.
- Kim DY, Stewart TB, Bauer RW, Mitchell M (2002) *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis* Now Endemic in Louisiana Wildlife. *J Parasitol* 88(5): 1024-1026.
- Kistler WM, Brown JD, Allison AB, Nemeth NM, Yabsley MJ (2014) First report of *Angiostrongylus vasorum* and *Hepatozoon* from a red fox (*Vulpes vulpes*) from West Virginia, USA. *Vet Parasitol* 200:216-220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.007>
- Koch J, Willesen JL (2009) Canine pulmonary angiostrongylosis: An update. *The Veterinary Journal* 179:348-359. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.11.014>
- Li DN, He A, Wang Y, Liang Y, Li ZY, Men JX, Zhan XM (2001) Three lethal cases of *Angiostrongylus cantonensis* infected children. *Chung-Kuo Chi Sheng Chung Hsueh Yu Chi Sheng Chung Ping Tsa Chih. Chinese J Parasitol & Paras Dis* 19:310-311.
- Lima WS, Guimarães MP, Lemos IS (1994) Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of the Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. *J Helminthol* 68:87.
- Lunn JA, Lee R, Smaller J, MacKay BM, King T, Hunt GB (2012) Twenty-two cases of canine neural angiostrongylosis in eastern Australia (2002-2005) and a review of the literature. *Parasit Vectors* 5:70. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-70>
- Ma G, Dennis M, Rose K, Spratt D, Spielman D (2013) Tawny frogmouths and brushtail possums as sentinels for *Angiostrongylus cantonensis*, the rat lungworm. *Vet Parasitol* 192:158-165. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.009>
- Mason KV, Prescott CW, Kelly WR, Waddell AL (1976) Granulomatous encephalomyelitis of puppies due to *Angiostrongylus cantonensis*. *Aust vet J* 52:295.

- McKenzie RA, Green PE, Wood AD (1978) *Angiostrongylus cantonensis* infection of the brain of a captive Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus*). Aust Vet J 54: 86-88.
- Miething F, Hering S, Hanschke B, Dressler J (2006) Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. J Histochem Cytochem 39: 351–354. <http://doi.org/10.1369/jhc.5B6726.2005>
- Morgan ER, Tomlinson A, Hunter S, Nichols T, Roberts E, Fox MT, Taylor MA (2008) *Angiostrongylus vasorum* and *Eucoleus aerophilus* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. Vet Parasitol 154:48-57. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.030>
- Poli A, Arispici M, Marroncini A, Mancianti F, de Monte D (1984) *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1886) in red foxes (*Vulpes vulpes* L.) in Italy. J Wildl Dis 20:345–346.
- Prociv P, Spratt DM, Carlisle MS (2000) Neuro-angiostrongyliasis: unresolved issues. International Journal for Parasitology 30:1295–1303. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00133-8)
- Qvarnstrom Y, Silva ACA, Teem JL, Hollingsworth R, Bishop H, Graeff-Teixeira C, Silva AJ (2010) Improved Molecular Detection of *Angiostrongylus cantonensis* in Mollusks and Other Environmental Samples with a Species-Specific Internal Transcribed Spacer 1-Based TaqMan Assay. Applied and Environmental Microbiology 76(15): 5287–5289.
- Reddacliff LA, Bellamy TA, Hartley WJ (1999) *Angiostrongylus cantonensis* infection in grey-headed fruit bats (*Pteropus poliocephalus*). Australian Veterinary Journal 77(7):466-468.
- Robles MR, Kinsella JM, Galliari C, Navone GT (2016) New host, geographic records, and histopathologic studies of *Angiostrongylus* spp (Nematoda: *Angiostrongylidae*) in rodents from Argentina with updated summary of records from rodent hosts and host specificity assessment. Mem Inst Oswaldo Cruz 111(3):181-191. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150371>
- Santoro M, D'Alessio N, Di Prisco F, Neola B, Restucci B, Pagano TB, Veneziano V (2015) *Angiostrongylus vasorum* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. Acta Parasitologica 60(2):356–359. <http://doi.org/10.1515/ap-2015-0050>
- Segovia, JM, Torres J, Miquel J, Llana L, Felie C (2001). Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. J Helminthol 75: 183–192.
- Simpson VR, Tomlinson AJ, Stevenson K, JA ML, Benavides J, Dagleish MP (2016) A post-mortem study of respiratory disease in small mustelids in south-west England. BMC Vet Res 12:72.

- Staden R, Judge DP, Bonfield JK (2003) Managing Sequencing Projects in the GAP4 Environment. Introduction to Bioinformatics. A theoretical and practical approach, p.327-344. In: Krawetz SA, Womble DD (Eds), Human Press Inc., Totawa, NJ 07512. Edited by Human Press Inc NJ 07512.
- Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol Biol Evol* 9:678-687.
- Thiengo SC, Simões RO, Fernandez MA, Júnior AM (2013) *Angiostrongylus cantonensis* and Rat Lungworm Disease in Brazil. *Hawaii J Med Public Health*72(6):18-22.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-4680.
- Torres J, Miquel J, Motjé M (2004) Helminth parasites of the eurasian badger (*Meles meles* L.) in Spain: a biogeographic approach. *Parasitol Res* 87:259–263. <http://doi.org/10.1007/s10344-003-0032-x>
- Travassos L (1927) Novos nematódeos. *Bol Biol* 6:52-61.
- Traversa D, Torbidone A, Malatesta D, Guglielmini C (2008) Occurrence of fatal canine *Angiostrongylus vasorum* infection in Italy. *Vet Parasitol* 152:162–166. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.009>
- Vieira FM, Muniz-Pereira LC, Souzalima S, Rocha BM, Luque JL (2017) Parasitic nematodes of three species of wild carnivore mammals from Atlantic forest in the state of Minas Gerais, Brazil. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88: 801-806.
- Wang X, Tedford RH, Van Valkenburgh B, Wayne RK (2004) Ancestry: Evolutionary history, molecular systematics, and evolutionary ecology of *Canidae*. In *The Biology and Conservation of Wild Canids* (ed. MacDonald, D. W. and Sillero-Zubiri, C.) pp. 39–54. Oxford University Press, Oxford, UK.
- 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. *Vet Record* 158:858-863. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.158.25.858>

Tabela 1- Infecção por *Angiostrongylus* spp. em *C. thous* e *L. gymnocercus* na região sul: espécies de canídeos selvagens infectada, vida livre/cativeiro, causa de morte, tipo de amostra, método de diagnóstico e espécies de *Angiostrongylus* sp. detectada.

	Espécie animal	Vida livre/cativeiro	Causa de morte	Amostra	PCR	HE	Espécie de <i>Angiostrongylus</i> sp. no PCR
1	<i>C. thous</i>	Cativeiro	Cinomose	Bloco de parafina	-	+	
2	<i>L. gymnocercus</i>	Vida livre	Cinomose e rangeliose	Bloco de parafina	-	+	
3	<i>C. thous</i>	Cativeiro	Pneumonia por <i>Angiostrongylus</i> spp.	Bloco de parafina	-	+	
4	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Bloco de parafina	-	+	
5	<i>C. thous</i>	Vida livre	Cinomose	Bloco de parafina	-	+	
6	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Bloco de parafina	+	-	<i>A. cantonensis</i>
7	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Bloco de parafina	+	-	<i>A. cantonensis</i>
8	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Bloco de parafina	-	+	
9	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Amostra fresca	+	-	<i>A. cantonensis</i>
10	<i>C. thous</i>	Vida livre	Cinomose	Amostra fresca	+	+	<i>A. cantonensis</i>
11	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Amostra fresca	+	+	<i>A. cantonensis</i>
12	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo*	Amostra fresca**	+***	+	<i>A. cantonensis</i>
13	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Amostra fresca	+	-	<i>A. vasorum</i>
14	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Amostra fresca	+	+	<i>A. cantonensis</i>
15	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Amostra fresca	-	+	
16	<i>C. thous</i>	Vida livre	Traumatismo	Amostra fresca	-	+	

C. thous* com lesão encefálica de malácia e hemorragia. ** Amostra fresca de pulmão e cérebro. * positivo em pulmão e cérebro. + positivo. - negativo.

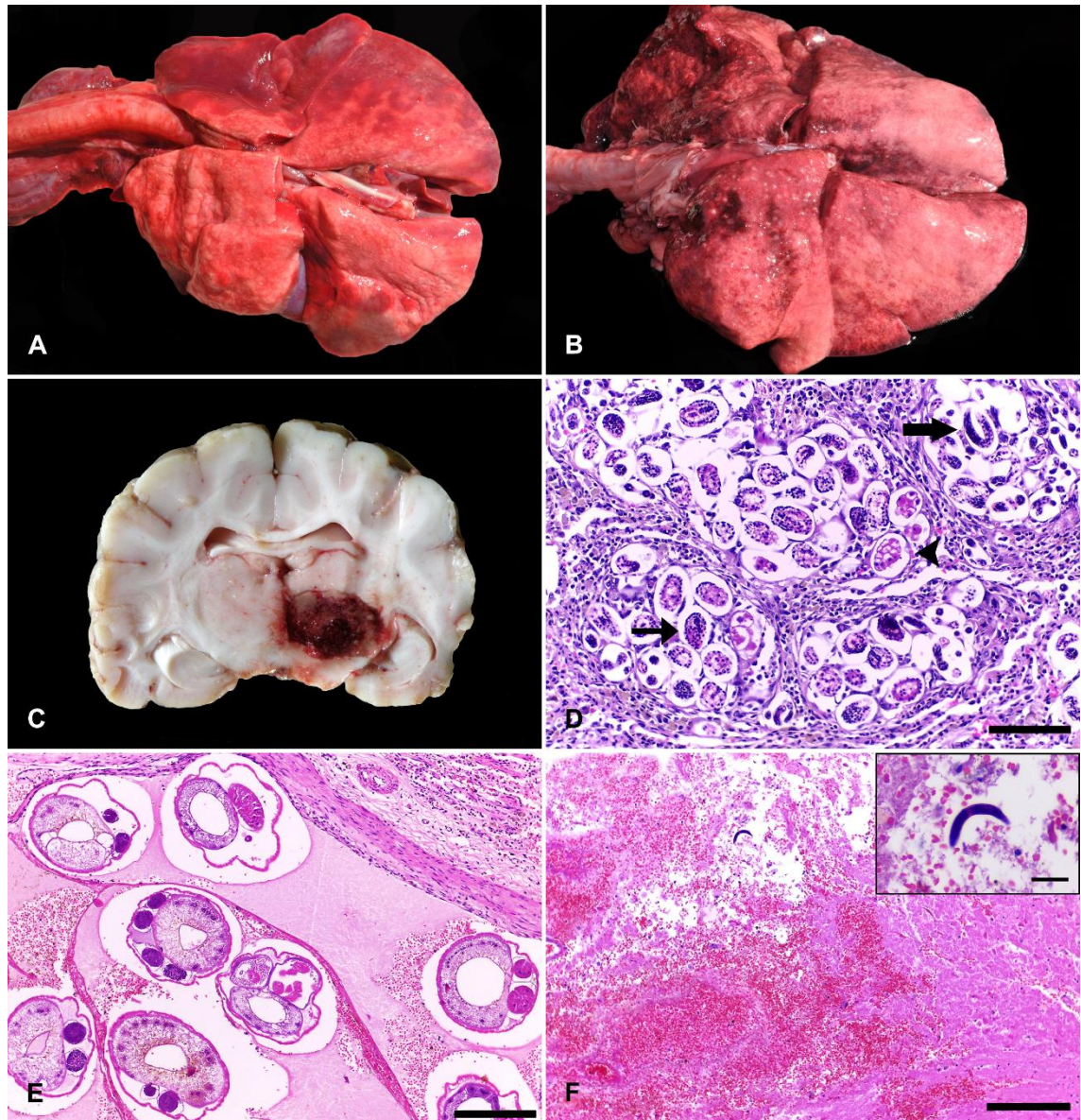


Fig. 1. Achados macroscópicos e microscópicos de infecção por *Angiostrongylus* spp. em canídeos selvagens. **A.** pulmões não colabados, com áreas multifocais consolidadas, de coloração vermelho escura. **B.** pequenos nódulos, brancacentos e firmes distribuídos multifocalmente em todos os lobos pulmonares. **C.** área focalmente extensa de amolecimento e hemorragia no tálamo. **D.** pulmão, em interstício e espaços alveolares, ovos morulados (ponta da seta), ovos larvados (seta fina) e larvas L1 (seta grossa) (Bar 100 μ m). Coloração por HE. **E.** pulmão, nematódeos adultos no interior da artéria (Bar 200 μ m). Coloração por HE. **F.** cérebro, área focalmente extensa de malacia, com rarefação do neuropilo, células gitter, hemorragia e larva dispersa em meio à lesão (Bar 200 μ m). Detalhe: larva dispersa em meio à lesão (Bar 40 μ m). Coloração por HE.

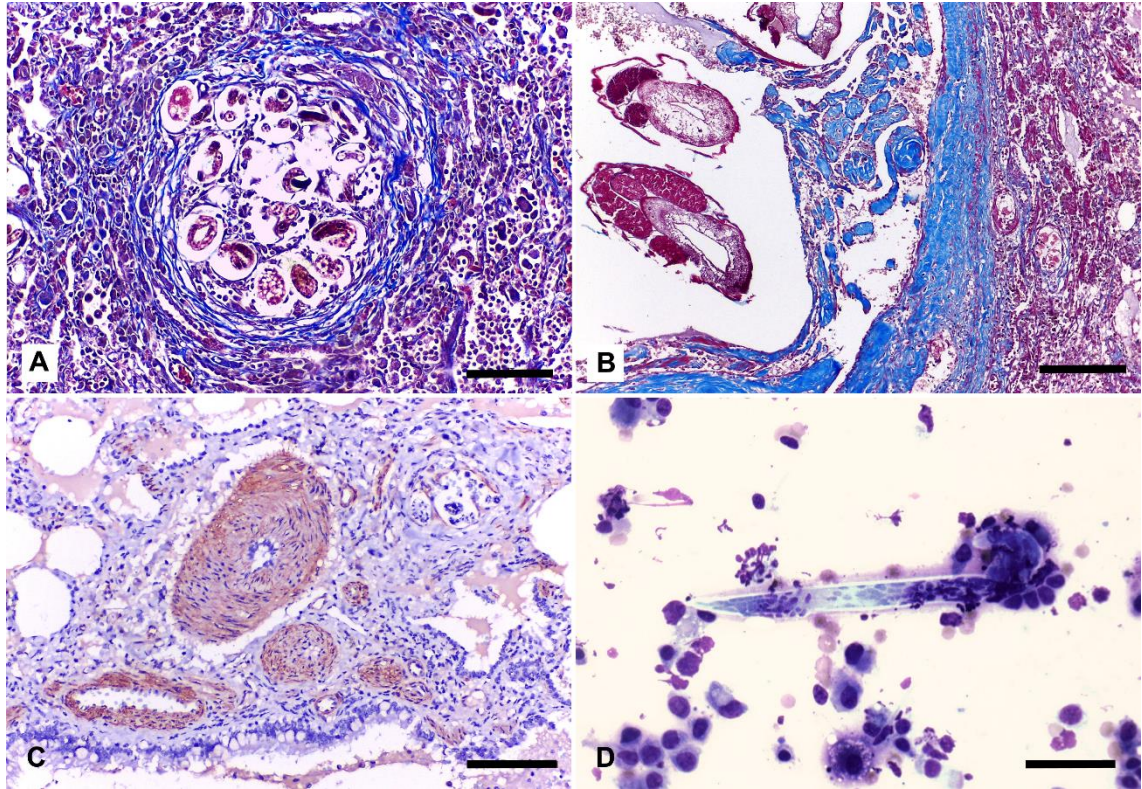


Fig. 2. Aspectos microscópicos da infecção por *Angiostrongylus* spp. em canídeos selvagens. **A.** pulmão, larvas e ovos circundados por proliferação de tecido conjuntivo fibroso (fibrose). Técnica histoquímica de Tricrômico de Masson (Bar 100 μm). **B.** pulmão, parede da artéria pulmonar espessada devido à deposição de tecido conjuntivo fibroso. Técnica histoquímica de Tricrômico de Masson (Bar 200 μm). **C.** pulmão, imunomarcção para anti-actina de músculo liso com evidencia de hiperplasia e hipertrofia de musculatura lisa de arteríolas. IHQ, AEC (Bar 100 μm). **D.** pulmão, larva em *imprint* realizado do tecido pulmonar durante à necropsia. Corado com corantes do tipo *Romanowsky* (*Diff-Quik*®) (Bar 40 μm).

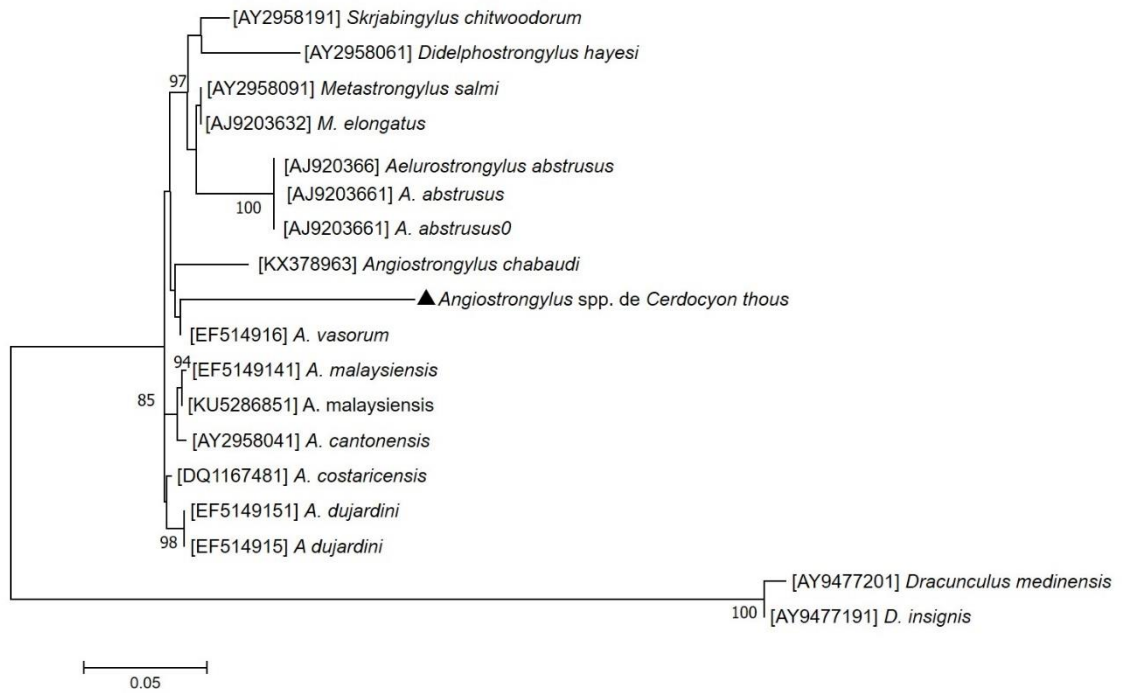


Fig. 3. Árvore filogenética dos gêneros metastrongiloides *Angiostrongylus*, *Aelurostrongylus*, *Didelphostrongylus*, *Metastrongylus* e *Skrjabinstrongylus* através da sequência do gene 18S de rRNA. Em destaque a sequência obtida.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho identificou que 55% dos canídeos selvagens analisados foram parasitados por *Angiostrongylus* spp., sendo um *L. gymnocercus* e o restante *C. thous*.

Macroscopicamente, nos pulmões haviam áreas multifocais de consolidação, de coloração vermelho escura, e em um caso haviam nódulos brancacentos e firmes distribuídos multifocalmente em todos os lobos pulmonares. Em um animal, foi possível observar no cérebro, área focalmente extensa de amolecimento (malacia) associada à hemorragia. Na histologia havia pneumonia ou broncopneumonia granulomatosa e na lesão encefálica observou-se área focalmente extensa de malacia, hemorragia, trombose e larva dispersa em meio à lesão.

Através de técnicas moleculares, PCR em tempo real para o gene ITS-1, foi possível identificar sete animais com infecção por *A. cantonensis*, todos *C. thous*. Pela técnica de sequenciamento do gene 18S, foi possível identificar um *C. thous* com infecção por *A. vasorum*. Esta amostra apresentou 97% de similaridade com sequências de *A. vasorum* depositadas no *GenBank*, o que pode ser uma nova espécie ou subespécie, portanto sugerimos novos estudos. A infecção em *L. gymnocercus* por *Angiostrongylus* spp. foi confirmada pela visualização de HE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.; SZYFRES, B. Zoonoses and communicable diseases man and animals. 3 ed. **Pan American Health Organization, Scientific and Tech Publications**, Washington DC, p. 404, 2003.

BOLT, G. *et al.* The common frog (*Rana temporaria*) as a potential paratenic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitology Research**, v. 79, p. 428-430, 1993.

BOLT, G. *et al.* Canine angiostrongylosis: a review. **Veterinary Record**, v. 135, p. 447-452, 1994.

CALDEIRA, R.L. *et al.* First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 887-889, 2007.

COWIE, R.H. Biology, Systematics, Life Cycle, and Distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the Cause of Rat Lungworm Disease. **Hawaii Journal of Medicine & Public Health**, v. 72, n. 6, p. 6-9, 2013.

DUARTE, F.H. *et al.* Occurrence *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) (Nematoda, *Angiostrongylidae*) in *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 (*Carnivora, Canidae*) in Minas Gerais State Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 1086-1088, 2007.

EAMSOBHANA, P.; YONG, H.S. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: *Angiostrongylidae*). **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 425-431, 2009.

FERREIRA-JÚNIOR, J.A. *et al.* Anatomopathological aspects of parasitism by nematodes of the superfamily Metastrongyloidea in wild crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Midwestern Brazil. **Ciencia Rural**, v. 47, n. 2, p. 1-4, 2017.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SILVA, A.C.; YOSHIMURA, K. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 322-348, 2009.

JEFFERY, R.A. *et al.* *Angiostrongylus vasorum* and *Crenosoma vulpis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Newfoundland, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 82, p. 66-74, 2004.

KOCH, J.; WILLESEN, J.L. Canine pulmonary angiostrongylosis: An update. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 348-359, 2009.

LI, D.N. *et al.* Three lethal cases of *Angiostrongylus cantonensis* infected children. **Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, v. 19, n. 5, p. 310-311, 2001.

- LIMA, W.S.; GUIMARÃES, M.P.; LEMOS, I.S. Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of the Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. **Journal of Helminthology** v. 68, p. 87, 1994.
- LUNN, J.A. *et al.* Twenty-two cases of canine neural angiostrongylosis in eastern Australia (2002-2005) and a review of the literature. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 70, 2012.
- MALDONADO, A.; SIMÕES, R.; THIENGO, S.C. Angiostrongyliasis in the Americas. In Lorenzo-Morales, J. (ed.), Zoonosis, **In Tech**, Rijeka, p. 303-320, 2012.
- MARTINS, Y.C.; TANOWITZ, H.B.; KAZACOS, K.R. Central nervous system manifestations of *Angiostrongylus cantonensis* infection. **Acta Tropica**, v. 141, p. 46-53, 2015.
- MORASSUTTI, A.L. *et al.* Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 4, p. 399-407, 2014.
- MORGAN, E.R. *et al.* *Angiostrongylus vasorum*: a real heartbreaker. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 49-51, 2005.
- POLI, A. *et al.* *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1886) in red foxes (*Vulpes vulpes* L.) in Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, p. 345-346, 1984.
- PROCIV, P.; SPRATT, D.M.; CARLISLE, M.S. Neuro-angiostrongyliasis: unresolved issues. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1295-1303, 2000.
- ROBLES, M.R. *et al.* New host, geographic records, and histopathologic studies of *Angiostrongylus* spp (Nematoda: *Angiostrongylidae*) in rodents from Argentina with updated summary of records from rodent hosts and host specificity assessment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 3, p. 181-191, 2016.
- SANTORO, M. *et al.* *Angiostrongylus vasorum* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. **Acta Parasitologica**, v. 60, n. 2, p. 356-359, 2015.
- SPRATT, D.M. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: a review. **The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 178-189, 2015.
- TAYLOR, C. *et al.* Increased prevalence and geographic spread of the cardiopulmonary nematode *Angiostrongylus vasorum* in fox populations in Great Britain. **Parasitology**, v. 142, p. 1190-1195, 2015.
- THIENGO, S.C. *et al.* The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, p. 194-199, 2010.
- THIENGO, S.C. *et al.* *Angiostrongylus cantonensis* and Rat Lungworm Disease in Brazil. **Hawaii Journal of Medicine & Public Health**, v. 72, n. 6, p. 18-22, 2013.

TRAVASSOS, L. Novos nematódeos. **Boletim biológico**, v.6, p. 52-61, 1927.
 TSAI, H.C. *et al.* Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 2, p. 222-226, 2004.

VIEIRA, F.M. *et al.* Parasitic nematodes of three species of wild carnivore mammals from Atlantic forest in the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 88, p. 801-806, 2017.

WANG, Q.P. *et al.* Human angiostrongyliasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 621-630, 2008.