



Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas

Trabalho de Conclusão de Curso

Riqueza, distribuição e determinantes ambientais de moluscos terrestres associados a *Angiostrongylus cantonensis*

Fábio Neves Souza

Salvador-Bahia-Brasil

2018

Universidade Federal da Bahia

Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas

Riqueza, distribuição e determinantes ambientais de moluscos terrestres associados a *Angiostrongylus cantonensis*

Fábio Neves Souza

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao colegiado de Ciências Biológicas, no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr^a Ticiania Soares de Andrade de Carvalho Pereira

Co-orientador: Dr. Federico Costa

Salvador-Bahia-Brasil

2018

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	10
CAPÍTULO 1	12
Introdução.....	13
Métodos	15
Resultados	16
Discussão	21
Conclusão	25
Referências	26
Figuras e Tabelas	34
Material suplementar	46

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Mapa da área de estudo com os pontos amostrados, considerando a presença e ausência de moluscos terrestres (A). Proporção e abundância de moluscos terrestres por pontos de amostragem, agrupados por vale, vales 1, 2 e 3 em (B), (C) e (D), respectivamente. As abundâncias representadas nos mapas foram analisadas por ponto de coleta, em que cada escala do gráfico varia de um valor mínimo (zero) ao valor máximo de indivíduos encontrados em cada ponto. Os valores entre parênteses representam o número de larvas extraídas de cada espécie de molusco encontrada. A confirmação da presença de *A. cantonensis* no ponto de amostragem e a espécie onde foi encontrada este helminto é representada por (**).

Figura 2- Porcentagens médias de ocorrência de *Subulina octona*, *Bulimulus* sp e *Achatina fulica* em função da presença de água (A – C); e porcentagens médias de ocorrência de *Sarasinula marginata*, *S. octona* e *Bulimulus* sp em função do esforço amostral em dias (D – F). As barras representam erro padrão.

Figura 3- Relação entre a probabilidade de infecção por *A. cantonensis* pela umidade.

Tabela 1. Prevalência e abundância de moluscos terrestres

Tabela 2. Análise morfológica e molecular das larvas coletadas em moluscos terrestres.

Tabela 3. Descritivo da abundancia e prevalência de *Angiotrongylus* sp. por ponto.

Tabela 4- Modelos probabilísticos univariados (esquerda), multivariados (centro) e seleção de modelos (direita) (glm, family=binomial negativa) dos fatores de riscos associados à ocorrência de moluscos terrestres.

Tabela 5- Modelos univariados (esquerda), multivariados (centro) e seleção de modelos (direita) (glm, family=binomial negativa) dos fatores de riscos associados à intensidade de ocorrência de moluscos terrestres.

SOUZA, F.N.. Riqueza, distribuição e determinantes ambientais de moluscos terrestres associados a *Angiostrongylus cantonensis*. 47 pp. Monografia – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018

RESUMO

Ambientes urbanos carentes favorecem o estabelecimento e distribuição de animais vetores e hospedeiros do parasita helmíntico *Angiostrongylus cantonensis*. O ciclo de vida deste helminto tem moluscos terrestres como hospedeiros intermediários e roedores, como *Rattus norvegicus*, como hospedeiro definitivo. As condições ambientais do ambiente urbano de comunidades populares (p. ex. presença de lixo e esgotos abertos) contribuem para a manutenção do ciclo deste parasita que pode ser um risco para a saúde pública, já que este helminto ao infectar humanos pode causar meningite eosinofílica. A adaptabilidade e a baixa especificidade de *A. cantonensis* em infectar diferentes espécies de moluscos terrestres são fatores que dificultam a obtenção sistemática de estimativas de prevalência do parasita nestas espécies. O objetivo do presente estudo foi identificar espécies de hospedeiros intermediários de *A. cantonensis* em um ambiente urbano e verificar os fatores de risco associados a infecção e a intensidade por este parasita em tais hospedeiros. Para tanto, inicialmente, fizemos a coleta e identificação de espécies de moluscos terrestres em uma área urbana de comunidade carente no Brasil, permitindo a descrição de sua distribuição e abundância. Em seguida, estimamos prevalência e intensidade de infecção por *A. cantonensis* nas espécies de molusco identificadas, através de métodos de morfologia larval e PCR convencional (identificação ao nível de espécie). A partir da aplicação de modelos lineares generalizados avaliamos os fatores de riscos ambientais associados a presença e intensidade de moluscos terrestres no ambiente urbano e à infecção por *A. cantonensis*. Encontramos oito espécies de moluscos terrestres, sendo quatro delas – *Subulina octona*, *Sarasinula marginata*, *Achatina fulica* e *Bulimulus* sp., que já são descritas na literatura como hospedeiros intermediários para *A. cantonensis* – em elevada abundância e positivas para *A. cantonensis*. *A. fulica* apresentou maior prevalência (33%) e intensidade de infecção com valor médio de $22,66 \pm \sigma 22,54$ larvas por indivíduos. A presença de água corrente apresentou uma tendência associada a ocorrência de *A. fulica*, *S. octona* e *Bulimulus* sp. Avaliando a intensidade de moluscos, novamente, variáveis

relacionadas a presença de água (presença de água corrente, chuva acumulada, presença de esgoto aberto e umidade acumulada) foram associadas ao aumento da intensidade de ocorrência das espécies avaliadas. Quanto à infecção destes animais por *A. cantonensis*, a umidade acumulada apresentou uma associação marginal positiva com a chance de os moluscos serem encontrados infectados. Elevada riqueza e abundância de moluscos hospedeiros de *A. cantonensis*, ocorrendo concomitantemente em uma pequena área (0,17 Km²), pode significar risco para os residentes dessa comunidade urbana, já afetada por outras zoonoses. No entanto, este risco tem sido negligenciado. Estudos epidemiológicos para investigar o contato da população humana com a infecção por *A. cantonensis* são necessários, já que muitos casos de meningite eosinofílica podem ser confundidos com outras patologias. Ainda, consideramos que intervenções de infraestrutura urbana que visem reduzir o contato dos humanos com esgotos abertos, por exemplo, devem controlar, paralelamente, o contato com hospedeiros de *A. cantonensis*.

Palavras chave: *Angiostrongylus* ; caramujos e lesmas; riscos; infecção acidental; meningite

SOUZA, F.N.. **Richness, distribution and environmental determinants of terrestrial molluscs associated with *Angiostrongylus cantonensis*** 47 pp. Monografia – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018

ABSTRACT

The environment of urban slums favours the establishment and distribution of vectors and reservoirs of the helminthic parasite *Angiostrongylus cantonensis*. Its life cycle includes a development phase in terrestrial molluscs (intermediate hosts) and final stages of development within rodents (definitive host), such as *Rattus norvegicus*. The poor conditions found in slums (e.g., lack of garbage collection and open sewers) benefit the maintenance of *A. cantonensis* cycle, which can be of public health importance, given that this helminth may cause eosinophilic meningitis in humans. The adaptability and low specificity of *A. cantonensis* in infecting different molluscs species are factors which can hamper the systematic generation of prevalence estimates of this nematode in these species. The aim of the present study was to identify species of intermediate hosts of *A. cantonensis* in an urban environment and to assess the risk factors associated with the presence and intensity of infection by this parasite in these hosts. Initially, we collected and identified terrestrial molluscs species in an urban Brazilian slum, presenting descriptive metrics of abundance and distribution. Then, we estimated the prevalence and intensity of *A. cantonensis* infection for each mollusc species, based on morphological and conventional PCR analyses (identification to the species level). We used generalized linear models to identify the risk factors associated with the presence and intensity of occurrence of the intermediate hosts in the urban environment, as well as the ones associated with *A. cantonensis* infection in these hosts. We identified eight species of terrestrial molluscs, in which four of them – *Subulina octona*, *Sarasinula marginata*, *Achatina fulica* and *Bulimulus* sp., previously described as *A. cantonensis* intermediate hosts – were found in high abundance and positive to *A. cantonensis* infection. *A. fulica* was found with the highest prevalence (33%) and intensity of infection, with a mean value of $22.66 \pm \sigma 22.54$ larvae per individual. The presence of running water (e.g., open sewers) was marginally associated with the occurrence of *A. fulica*, *S. octona* and *Bulimulus* sp. In terms of intensity of molluscs,

variables related to the presence of water (running water, cumulative rain, open sewers and cumulative moisture) were associated with the increase in the number of individuals of the mollusc species identified. Regarding *A. cantonensis* infection, increase in cumulative moisture was marginally associated with the chance of a terrestrial mollusc being found infected. The high richness and abundance of mollusc hosts of *A. cantonensis* found, occurring concomitantly in a small area (0.17km²), may result in increased spillover risk for the residents of the urban slum, already affected by other zoonoses. Nevertheless, this risk has been neglected. Epidemiological studies to investigate the contact of the human population with *A. cantonensis* infection are needed, given that many cases of eosinophilic meningitis can be misdiagnosed. Moreover, we suggest that infrastructural interventions focused on reducing the contact of humans to open sewers might, in parallel, control their contact with *A. cantonensis* intermediate hosts.

Keywords: *Angiostrongylus*; snails and slugs; risks; spillover risk; meningitis

INTRODUÇÃO GERAL

Dentro do filo Mollusca, a classe gastropoda é a mais abundante e diversificada, ocupando diferentes ambientes e apresentando uma variedade de planos corporais e histórias de vida, que contribuem para adaptabilidade em diferentes habitats. Esta classe é composta por lesmas e caracóis, que ocupam tanto ambientes aquáticos (marinhos ou dulciaquícolas), quanto ambientes terrestres, existindo dependência de microclimas estáveis. Devido a adaptabilidade em diferentes ambientes, os moluscos gastrópodes servem como reservatório de diversas espécies de helmintos, como os pertencentes ao filo Trematoda (e.g. *Fasciola Hepatica*, *Schistosoma mansoni*) e Nematoda (e.g. *Angiostrongylus* spp.), que podem ser de importância para saúde pública. O nematoide *A. cantonensis*, é amplamente distribuído mundialmente e, a infecção, por ingestão de sua larva infectante, pode ocasionar meningite eosinofílica em humanos. Para completar seu ciclo de vida, o *A. cantonensis* precisa necessariamente de dois hospedeiros: um intermediário e um definitivo. Espécies de caracóis como *Achatina fulica*, *Bradybaena similaris* e *Subulina octona*, além de lesmas dos gêneros *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras* estão entre os principais hospedeiros intermediários de *A. cantonensis*, enquanto os roedores (e.g., a ratazana *Rattus norvegicus*), como os principais hospedeiros definitivos deste parasita. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais, pois são contaminados a partir de alimentos contendo a forma infectante que, então, migra para o sistema nervoso central (SNC), causando assim meningite eosinofílica ou move-se para a câmara do olho, causando angiostrongilíase ocular.

A meningite eosinofílica, anteriormente restrita ao sudeste asiático, é uma doença emergente no Brasil. Nas grandes cidades, é possível observar regiões densamente populosas e com condições precárias de moradia, saneamento básico e acesso a saúde. Nestas áreas, condições ambientais, como a presença de esgoto céu

aberto e coleta de lixo irregular, favorecem o crescimento e estabelecimento de populações de gastrópodes terrestres e de roedores, o que conseqüentemente contribui para a manutenção e expansão dos ciclos de diversos parasitas, com é o caso do *A. cantonensis*. Recentemente foi identificada infecção por *A. cantonensis* em uma população de *R. norvegicus* em uma favela na cidade de Salvador, sugerindo que o ciclo de vida deste parasita está ativo nesta área, e que a população humana residente pode estar sujeita ao risco de infecção.

Em função da generalidade de *A. cantonensis* com relação a diversidade de hospedeiros intermediários, em paralelo a ampla distribuição dos gastrópodes terrestres no Brasil, entender os fatores de risco é fundamental para o manejo, controle e prevenção de risco de infecção por este parasita. Apesar de existirem registros de ocorrência de *A. cantonensis* em ratazanas e gastrópodes terrestres em diferentes regiões no Brasil, existem lacunas sobre os fatores ambientais que podem estar associados à infecção por *A. cantonensis* nas populações destes moluscos, assim como as taxas de infecção dos mesmos por *A. cantonensis*, principalmente em ambientes urbanos carentes onde as condições ambientais precárias somadas às condições sociais de pobreza afetam os hospedeiros de *A. cantonensis* e, conseqüentemente, afetam a exposição humana a este parasita. Compreender aspectos da história de vida dos moluscos hospedeiros intermediários de *A. cantonensis* é fundamental para entender a relação parasita-reservatório no ambiente, assim como para notificar o setor de saúde sobre sua presença. Adicionalmente, identificar fatores de riscos associados a exposição dos moluscos terrestres por *A. cantonensis* permitirá auxiliar o controle destes reservatórios, e potencialmente reduzirá a probabilidade de infecção da população humana pelo nematoide.

1 CAPITULO 1

2 Revista: *EPIDEMIOLOGY AND INFECTION (A1 Saúde, B1 Biodiversidade)*

3 Título: **Riqueza, distribuição e determinantes ambientais de moluscos**
4 **terrestres associados a *Angiostrongylus cantonensis***

5

6

7 Autores e Afiliações:

8 Fábio N. Souza ^{1,2}, Daniele A. Alves ^{1,2}, Maísa A. Santos ^{1,2}, Leyva C. V. Melo ⁵ ,

9 Leonardo F. Santos ² , Ricardo Gava ⁵ , Mitermayer G. Reis^{1,2,4} , Albert I. Ko⁴ , Mike

10 Begon³ , Thiago C. Bahiense¹ , Federico Costa^{1,2,3,4} ,Ticiana Carvalho-Pereira^{1,2}.

11

12 ¹ Federal University of Bahia, UFBA, Salvador, Brazil; ² Institute Gonçalo Moniz,
13 Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Brazil; ³ Institute Adolfo Lutz,
14 São Paulo, Brazil; ⁴ Department of Epidemiology of Microbial Disease, Yale School of
15 Public Health, New Haven, United States;⁵ Institute of Integrative Biology, University of
16 Liverpool, Liverpool, United Kingdom.

17

18

19

20

21

22 **Introdução**

23 O parasita nematoide Metastrongyloidea *Angiostrongylus cantonensis* Chen,
24 1935, pertencente à família Angiostrongylidae Boehm & Gebauer, 1934, é um helminto
25 de importância para saúde pública, com ampla distribuição mundial (Wang et al. 2012;
26 Cowie 2013; Barratt et al. 2016). Ao infectar humanos, pode ocasionar meningite
27 eosinofílica (Pien et al. 1999; Wang et al. 2008; Graeff-Teixeira et al. 2009;
28 Sawanyawisuth et al. 2013; Eamsobhana 2014), sendo esta considerada uma doença
29 infecciosa endêmica do sudeste asiático e, atualmente, emergente em todo o mundo (Lv
30 et al. 2009; Hochberg et al. 2011; Espírito-Santo et al. 2013; Morassutti et al. 2014).

31 A propagação natural de *A. cantonensis* se dá por moluscos gastrópodes
32 terrestres – caracóis e lesmas – que são hospedeiros intermediários deste helminto. A
33 conclusão do ciclo de vida depende de hospedeiros definitivos, como iguanas, pássaros
34 e roedores (Wang et al. 2008; Chikweto et al. 2009). Os roedores, por exemplo, liberam
35 larvas de *A. cantonensis* nas fezes, que, por penetração cutânea, infectam os moluscos
36 terrestres, onde se desenvolvem em estágios larvais mais avançados. Por ingestão destes
37 moluscos ou de alimentos contaminados por seu muco, as larvas retornam para o
38 hospedeiro definitivo, completando os estágios de maturação (ver Cowie 2013 e Oehler
39 et al. 2014). Os humanos são hospedeiros acidentais, que, ao ingerirem alimentos
40 contaminados com a larva em estágio infectante, podem desenvolver meningite
41 eosinofílica ou angiostrongilíase ocular (Toma et al. 2002; Hochberg et al. 2011).

42 Áreas urbanas de comunidades humanas vulneráveis apresentam elevada
43 densidade populacional residindo em moradia precária com condições inadequadas de
44 saneamento. Tais condições são propícias para o estabelecimento de populações de
45 caracóis e lesmas e, também para a fauna sinantrópica, como a ratazana *Rattus*

46 *norvegicus* – um dos hospedeiros definitivos de *A. cantonensis* –, em estreito contato
47 com a população humana residente (Bradley et al. 2007; Chikweto et al. 2009;
48 Carvalho-Pereira et al. 2017). Diferentes espécies de moluscos terrestres, como os
49 caracóis *Achatina fulica* (Bowdich, 1822), *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) e
50 *Subulina octona* (Bruguière, 1798) e a lesma *Sarasinula marginata* (Semper, 1885), são
51 consideradas reservatórios de *A. cantonensis* (Malek e Cheng 1974; Carvalho et al.,
52 2012). A elevada adaptabilidade deste metastrongylideo em se desenvolver em
53 diferentes espécies hospedeiras pode aumentar a ameaça de infecção por este nematoide
54 para moradores de comunidades humanas populares, afetadas por diversos agentes
55 zoonóticos (Caldeira et al. 2007; Costa et al. 2015; Walker et al. 2016). Além disso, a
56 baixa especificidade de *A. cantonensis* com relação aos seus hospedeiros dificulta o
57 desenvolvimento de medidas de controle dos moluscos terrestres de importância para a
58 saúde pública (Wang et al. 2008). O controle, ainda, é prejudicado pela heterogeneidade
59 na paisagem urbana, de áreas abertas a residências com diferentes características, essas
60 diferenças na paisagem geram condições ambientais favoráveis para a riqueza e
61 abundância de moluscos terrestres e, conseqüentemente, a manutenção do ciclo *A.*
62 *cantonensis* (Su et al. 2009; Chaves et al. 2011; Rodelo-Urrego et al. 2013).

63 Em uma área urbana de comunidade popular no Brasil, foi identificada uma
64 prevalência de cerca de 40% de *A. cantonensis* em uma população de *R. norvegicus*
65 (Carvalho-Pereira et al., 2017), indicando que os residentes desta comunidade estão
66 expostos ao risco de infecção por *A. cantonensis*. Atualmente, no entanto, tal risco de
67 exposição não pode ser quantificado, uma vez que, em ambientes naturais, existe uma
68 ausência de informação sobre a prevalência de *A. cantonensis* nesta vasta diversidade de
69 hospedeiros intermediários (Teem et al., 2013). Dessa forma, o objetivo geral deste
70 estudo foi identificar os fatores de riscos associados à presença e à intensidade de

71 infecção de *Angiostrongylus cantonensis* em espécies hospedeiras intermediárias. Para
72 tanto, foram (i) identificadas as espécies hospedeiras intermediárias para este parasita,
73 descrevendo a distribuição espacial destes hospedeiros, (ii) avaliados os fatores de
74 riscos ambientais associados a presença e intensidade de moluscos terrestres, para,
75 finalmente, (iii) verificar os fatores de riscos ambientais associados à presença e à
76 intensidade de infecção por *A. cantonensis* em populações de moluscos terrestres.

77

78 **Métodos**

79 *Área de Estudo*

80 O estudo foi realizado no bairro de Pau da Lima, Salvador-Bahia, em uma área
81 de 0,17 Km², que está geograficamente dividida em três vales, com adensamento
82 populacional que varia de 13.742 a 128.997 habitantes/km² (IBGE, 2010). Esta
83 comunidade humana possui condições precárias de moradia e não tem acesso a
84 saneamento básico, o que propicia casos de doenças zoonóticas (Kikute et al, 2015;
85 Hagan et al, 2016).

86 *Desenho do estudo*

87 Foram espacialmente randomizados 40 pontos na área de estudo, compreendidos
88 nos três vales, e em cada ponto georreferenciado foi delimitada uma área de coleta com
89 raio 15m. A amostragem foi feita por busca ativa (Df 2008), no primeiro período do
90 dia. Foi feita uma varredura visual em cada ponto para coleta de caracóis e lesmas, e os
91 indivíduos capturados foram contabilizados por morfotipo e acondicionados em sacos
92 plásticos com gazes umedecidas. Isso garantiu a sobrevivência dos organismos até a
93 chegada ao laboratório. Paralelamente, em cada ponto amostral foi realizado um

94 inquérito ambiental a fim de investigar características ambientais, posteriormente
95 testadas como fatores de riscos para presença e abundância de moluscos terrestres e de
96 *Angiotrongylus cantonensis* (Tabela Suplementar S1).

97 *Processamento de amostras e Análises laboratoriais*

98 Os indivíduos de caramujos e lesmas coletados em cada ponto foram lavados em
99 água e transferidos para uma bandeja. Com auxílio de um paquímetro com precisão de
100 0,1 mm, os espécimes de caracóis foram medidos de acordo com o comprimento total
101 da concha, seguindo o método adaptado de Simião e Fischer (2004) e, dos espécimes de
102 lesmas foi aferido o tamanho do corpo pela distância da boca ao ânus. Os indivíduos
103 foram identificados a partir de caracteres morfológicos da concha com base na literatura
104 disponível (American & Bureau 1968; Barbosa 1995; Salgado 2003; Thiengo et al.,
105 2007; Df 2008; Colley 2012; Carvalho et al., 2012; Breure 2014).

106 Para a extração de larvas, os indivíduos do mesmo morfotipo com tamanho
107 inferior a dois centímetros foram analisados em *pool* de indivíduos (Carvalho et al.,
108 2012). Indivíduos maiores foram dessecados e analisados separadamente. Todos os
109 indivíduos ou grupo de indivíduos, por ponto de coleta, foram macerados para a
110 extração de larvas de helmintos, a partir da técnica do Rugai modificado (Rugai et al.,
111 1954).

112 A biomassa macerada de moluscos foi dividida em duas porções com auxílio de
113 um par de lâminas de microscópio. Cada porção de macerado foi espalhada em uma
114 base de 40 x 10 mm (e.g., base de placa de Petri) revestida por uma camada de seis
115 bandas de gaze. Em seguida, cada um destes conteúdos foi coberto por uma tampa e a
116 gaze foi invertida, formando uma espécie de trouxa, que foi inserida em ângulo de 45°
117 em um cálice contendo solução péptica (8 mg de pepsina, 1.4 ml de ácido clorídrico e

118 190.6 ml de água de clorada) (Figura S1) à aproximadamente 42°C. Tais conjuntos de
119 biomassa de moluscos foram identificados por ponto de coleta e morfotipo, e incubados
120 a 37°C por 2 horas para digestão tecidual e migração das larvas. As camadas de gaze
121 funcionariam como um filtro para, juntamente com a angulação da trouxa, facilitar a
122 migração das larvas da biomassa digerida para a solução, sedimentando no fundo dos
123 cálices. Após a incubação, foram coletados 20 ml de solução do fundo do cálice, de
124 cada conjunto individualmente, que foram transferidos para placas de Petri para serem
125 observados em estereomicroscópio binocular em 40x. Todas as larvas encontradas
126 foram contabilizadas e fixadas em álcool 70% em tubos identificados, posteriormente
127 mantidos em temperatura de -20°C. As análises morfométricas das larvas isoladas
128 foram feitas de acordo com metodologia estabelecida no Instituto Adolfo Lutz (IAL),
129 com a observação de medidas específicas de cada espécime, sendo elas: CTC –
130 comprimento total do corpo; L – largura; CE – comprimento do esôfago; DPE –
131 distância do poro excretor à extremidade anterior; DPG – distância do primórdio genital
132 à cauda; PG – comprimento do primórdio genital; e DAC – distância do ânus à cauda
133 (Figura S2). O estudo é baseado na taxonomia numérica por escore, segundo intervalos
134 de variações individuais de larvas L3 das cepas de referência de *A. cantonensis* e *A.*
135 *costaricensis* mantidas no IAL. A partir de uma matriz binária, o cálculo da similaridade
136 fenotípica (S) é dado pelo o número de caracteres coincidentes (nc) dividido pelo o
137 número de caracteres possíveis (np) multiplicado por 100, segundo a equação: $S =$
138 $\left(\frac{nc}{np}\right) * 100$. Todas as amostras de larvas classificadas como pertencentes ao grupo
139 Metastrongylidea após análise morfométrica foram processadas por PCR-RFLP
140 (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para confirmação molecular de *A.*
141 *cantonensis*, utilizando o método descrito por Caldeira et al. (2003).

142 *Analises de dados*

143 Foram estimadas as prevalências e abundâncias das espécies de caramujos e
144 lesmas na área de estudo, bem como a prevalência e intensidade de infecção (número de
145 larvas L2/L3) de *A. cantonensis* nas espécies de moluscos identificadas. Para identificar
146 fatores de risco ambientais associados tanto à presença e à intensidade de ocorrência¹
147 dos moluscos na área de estudo, quanto à infecção e à intensidade de infecção por *A.*
148 *cantonensis* nas espécies de hospedeiros intermediários, foram utilizados modelos
149 lineares generalizados em ambiente R (R Development Core Team 2011), considerando
150 nível de significância de $p=0,05$. Estes modelos foram desenvolvidos em estágios: após
151 a realização de análises univariadas – utilizando as variáveis coletadas durante a
152 amostragem de campo (Tabela Suplementar S1) - as variáveis ambientais que tenham
153 sido pelo menos marginalmente associadas ($p \leq 0,1$) foram incluídas nos modelos
154 múltiplos. A seleção de modelos foi baseada no critério de Akaike, corrigido para
155 mostras pequenas (AICc) (Hurvich & Tsai 1989), utilizando as funções *drop1()*,
156 *anova()*, *update()* e, finalmente, a função *model.sel()* do pacote "MuMIn", que organiza
157 os modelos por AICc, atribuindo pesos para cada modelo, conforme a importância das
158 variáveis explicativas incluídas nos mesmos. Assim, podem ser identificados todos os
159 modelos plausíveis ($\Delta AICc < 2,00$) e o mais parcimonioso, isto é, aquele com menor
160 número de variáveis explicativas dentre os modelos plausíveis.

161 *Comitê de ética*

162 A licença para coleta em área urbana de Salvador-Bahia foi fornecida pelo
163 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão federal

¹ A modelagem de fatores de risco para abundância de caracóis e lesmas levou em consideração apenas pontos positivos para cada espécie de molusco modelada, pois previamente foram desenvolvidos modelos para avaliar fatores associados ao risco de ocorrência (presença) dessas espécies. Dessa forma, a partir daqui o termo “intensidade” de moluscos foi utilizado para se referir à abundância de moluscos modelada, excluindo os pontos negativos para as espécies modeladas.

164 ligado ao Ministério de meio ambiente brasileiro. Nenhum dos espécimes coletados é
165 pertencente a espécies ameaçadas ou protegidas.

166 **Resultados**

167 Foram coletados 577 indivíduos de moluscos gastrópodes terrestres, amplamente
168 distribuídos nos três vales da área de estudo, representando 8 espécies e 7 famílias
169 (Tabela 1). As espécies de maior porcentagem de ocorrência foram *Subulina octona*
170 (47,5%), *Sarasinula marginata* (30%), *Achatina fulica* (25%) e *Bulimulus* sp. (22,5%),
171 sendo mais altas as abundâncias de *S. octona* e *A. fulica* (278 e 96, respectivamente).
172 Muitas dessas espécies ocorreram concomitantemente nos locais amostrados (Figura 1).

173 Com relação à positividade de larvas, previamente à análise molecular, foi
174 observada elevada prevalência de infecção, para a qual *A. fulica* e *S. octona*
175 apresentaram maiores intensidades comparado às espécies *S. marginata* e *Bulimulus* sp.,
176 embora as larvas incluíssem tanto metastrongylídeos, quanto não metastrongylídeos
177 (Tabela 2). Por meio do PCR-RFLP, foi estimada a prevalência específica de *A.*
178 *cantonensis* para cada uma dessas espécies de caramujos por ponto onde essas espécies
179 foram identificadas, a saber: *A. fulica* (33%), *Bulimulus* sp (11%), *S. marginata* (8%), *S.*
180 *octana* (5%) (Tabela 2 e 3). *A. fulica* apresentou a maior quantidade de larva por
181 indivíduo, com valor médio de $22.66 \pm \sigma 22.54$ larvas (Tabela 3). Quanto as demais
182 espécies, foram identificados baixos níveis de infecção, tendo apenas um indivíduo de *S*
183 *marginata* sido apresentado infectado com 4 larvas, por exemplo. Já *Bulimulus* sp. e *S.*
184 *octona* – que foram, geralmente, analisadas em *pool* apresentaram proporções de 0,5 e
185 0,3 larva por indivíduo, respectivamente. Informações sobre larvas de *A. cantonensis*,
186 fruto da identificação morfométrica, podem ser encontradas na Tabela 3, destacando a
187 ocorrência de larvas em estágio L2 de desenvolvimento.

188 Dentre os potenciais fatores de risco ambientais associados a presença das
189 espécies de moluscos na área de estudo, apenas água corrente apresentou uma
190 associação marginal positiva para a ocorrência das espécies *A. fulica* (Água, OR: 4,50
191 (IC 95%: 0,78-28,43); p=0.09), *S. Octona* (Água, OR: 7,23(IC 95%:0,96-76,09);
192 p=0.07) e *Bulimulus sp.* (Água, OR: 4,73(IC 95%: 0,71-37,39); p=0.09) (Figura 2, A-
193 C). No entanto, quando ajustado ao modelo múltiplo, o modelo mais parcimonioso para
194 as espécies *S. marginata*, *Bulimulus sp* e *S. octona* indicou que apenas esforço amostral
195 (EA) – variável utilizada como controle – foi significativamente associada à
196 probabilidade de presença destas espécies (Tabela 4). Um esforço amostral de três dias
197 indicou maior chance de encontrar *S. marginata*, *Bulimulus sp.* e *S. octona*, quando
198 comparado a dois dias (Figura 2, D-F). Por outro lado, no modelo ajustado para *A.*
199 *fulica* nenhuma das variáveis utilizadas foi significativa.

200 Uma vez presentes no ambiente, foram avaliados os fatores de risco associados à
201 intensidade de moluscos terrestres (Tabela 5). Nos modelos não ajustados foi observado
202 que *S. marginata* tem sua intensidade aumentada quando se tem a presença de esgoto
203 aberto, solo permeável e a presença de material de construção na área de estudo. Por
204 outro lado, para *A. fulica* o aumento de umidade foi associado com o aumento do
205 número de indivíduos desta espécie. Além disso, a variável EA mostrou-se significativa
206 para a intensidade de *A. fulica* na área de estudo. Para ambas as espécies, *S. marginata* e
207 *A. fulica*, a presença de água empoçada ou vazamentos pode aumentar a intensidade
208 destes moluscos. Para a espécie *S. octona* somente o cumulativo de chuva é um fator
209 que pode contribuir para a intensidade desta espécie no ambiente. Nos modelos
210 ajustados (múltiplos) apenas a presença de água corrente ou o aumento do volume de
211 chuva acumulada (mm) foram associadas ao aumento de intensidade de *S. marginata* e
212 *S. octona*, respectivamente (Tabela 5), enquanto a intensidade de *A. fulica* não foi

213 significativamente associada a nenhuma variável testada. O baixo número amostral
214 limitou o desenvolvimento de modelos de intensidade para a espécie *Bulimulus* sp.

215 Devido ao reduzido número de infecções identificadas como *A. cantonensis* nos
216 moluscos terrestres amostrados ($n = 7$), a modelagem de fatores de risco considerou
217 presença de *A. cantonensis* para os moluscos terrestres como grupo, em vez de ter sido
218 baseada em cada espécie individualmente. Apenas a variável umidade foi
219 marginalmente associada à presença de *A. cantonensis* no grupo de moluscos terrestres
220 amostrados (OR 1,17 IC 95% 0,98-1,43, $p=0,09$) (Figura 3). Não foi possível analisar os
221 fatores de riscos associados à intensidade de infecção devido ao baixo número de
222 infecções.

223

224 **Discussão**

225

226

227 Nossos resultados mostram que existem elevadas riqueza e porcentagem de
228 ocorrência de moluscos terrestres na área de estudo, comparado a outras localidades no
229 Brasil e no mundo (Carvalho et al., 2012; Kim et al., 2014; Barratt et al., 2016). A
230 presença das espécies *S. octana*, *A. fulica*, *S. marginata*, *Bulimulus* sp. e *Bradybaena* sp.
231 – que são hospedeiros já descritos para *A. cantonensis* –, por ocuparem diferentes
232 habitats, indica a ocorrência de mais focos de contaminação, o que é consistente com o
233 que foi encontrado por Kim, et al. (2014). O fato de as espécies de moluscos terrestres
234 ocorrerem em diversos pontos (muitas vezes em concomitância) e de forma heterogênea
235 na área de estudo sugere que o ciclo de vida de *A. cantonensis* está ativo em toda a área
236 estudada. Adicionalmente, isto indica que a população humana residente desta área está
237 exposta a infecção devido à proximidade com os hospedeiros intermediários do parasita.

238 O padrão de distribuição dos moluscos terrestres é influenciado pelas condições
239 ambientais locais e climáticas, por exemplo, as características do solo, vegetação e os
240 gradientes climáticos (Tattersfield et al., 2001; Bros et al. 2015). No nosso estudo,
241 houve uma tendência para que a presença de água – refletida em diversas medidas como
242 presença de água corrente, cumulativo de chuvas e umidade – indicasse maior chance de
243 encontrar algumas espécies de moluscos terrestres, como *S. marginata* e *S. octona*, bem
244 como maior número de indivíduos dessas espécies. Tais variáveis ambientais – que
245 refletem uma necessidade fisiológica dos moluscos terrestres – proporcionam
246 microclimas que favorecem maior adaptação para a sobrevivência e reprodução dos
247 moluscos terrestres (Webley, 1964; Crawford-Sidebotham, 1972; Astor et al. 2017).

248 A identificação de outros fatores de risco para presença ou intensidade de
249 caracóis e lesmas terrestres na área de estudo pode ter sido limitada pelo tamanho
250 amostral. A variável de esforço amostral, utilizada inicialmente como controle, destacou
251 que uma amostragem de três dias garantiria maior chance de encontrar indivíduos
252 comparado a dois dias, para a maioria das espécies avaliadas. Este achado, além de
253 inédito, merece ser ressaltado, pois, por mais que pareça óbvio, pode significativamente
254 alterar os diagnósticos de presença de hospedeiros intermediários de *A. cantonensis* até
255 então documentados, que não discriminam esforço de coleta. Outro fator que pode ter
256 limitado a identificação de fatores de risco ambientais para as espécies de moluscos
257 avaliadas pode estar relacionado ao fato de algumas espécies identificadas serem
258 consideradas generalistas, ocupando habitats que variam em uma faixa que compreende
259 desde ambientes úmidos a áreas abertas e secas (por exemplo, *S. octona* e *A. fulica*)
260 (Dias et al. 2007; Hollingsworth et al. 2007; Nunes et al. 2012; Hylander et al. 2014).
261 Por outro lado, a falta de associações significativas nos modelos ajustados com
262 variáveis ambientais não relacionadas à presença de água no presente estudo contraria a

263 biologia de algumas espécies de moluscos terrestres identificadas, que dependem de
264 fatores como tipo de substrato e vegetação para sobrevivência (Astor et al. 2017; Rosin
265 et al. 2017). *S. marginata*, por exemplo, dependem de solos permeáveis (como foi
266 demonstrado em nosso estudo), enquanto *B. similares* apresenta características
267 arborícolas e, portanto, tende a estar associada à vegetação (Gomes & Thomé 2004;
268 Brodie et al. 2011). É possível que a escolha de variáveis em uma escala ambiental mais
269 fina, apropriada para cada espécie de interesse, seja sensível para identificar os fatores
270 de risco, o que só seria possível após a identificação das espécies presentes na área.

271 Análise de micro-habitat pode ser uma abordagem mais adequada para entender
272 as histórias de vida das espécies de molusco encontradas, pois estas populações variam
273 e/ou dependem de microclimas e nutrientes, em função da baixa mobilidade dos seus
274 indivíduos e da alta susceptibilidade à predação (Rosin et al. 2017). As diferenças das
275 condições ambientais dentro da paisagem urbana, principalmente em áreas com
276 condições precárias de moradia e saneamento básico, propicia a existência de micro-
277 habitats (Labaune & Magnin 2001; Sólymos et al. 2009; Astor et al. 2014), o que afeta a
278 comunidade de moluscos terrestres alterando sua composição, abundância e
279 distribuição. Micro-habitats favoráveis a uma elevada densidade de moluscos terrestres
280 podem, por sua vez, contribuir para aumento de chance de indivíduos de caracóis e
281 lesmas de abrigarem o parasita *A. cantonensis*. (Simões et al., 2014; Barbato et al.,
282 2017)

283 A discrepância entre a prevalência de larvas por espécie de molusco, bem como
284 entre o número de larvas, pré- e pós-análise molecular (Tabelas 2 e 3), pode ser devido a
285 esses animais serem hospedeiros intermediários de outros helmintos além de *A.*
286 *cantonensis* (Mackerras et al. 1980; Helm et al. 2010; Jezewski et al. 2013). A maior
287 prevalência de *A. cantonesis* em *A. fulica* é consistente com outros estudos (Barratt et al.

288 2016). Isto pode estar associado ao fato de *A. fulica* ser uma espécie invasora no Brasil,
289 não possuindo nicho específico, e podendo ocupar diferentes habitats, o que aumenta a
290 chance de alojamento deste helminto (Teles et al. 1997). A capacidade de *A.*
291 *cantonensis* não ter especificidade de espécies de hospedeiros intermediários contribui
292 para o aumento da chance de manutenção do seu ciclo de vida no ambiente, o que pôde
293 ser evidenciado em nosso estudo pela presença de larvas de *A. cantonensis* em quatro
294 espécies de moluscos hospedeiros e em estágios larvais iniciais de desenvolvimento
295 (Tabela 3). Nossos resultados mostraram tendência positiva da umidade sobre a
296 frequência de caramujos infectados com *A. cantonensis*, o que pode estar relacionado ao
297 fato de esta variável contribuir para a viabilidade da larva no ambiente (fezes do rato). A
298 presença de larvas viáveis no ambiente, por sua vez, pode aumentar o número de
299 moluscos parasitados por este helminto, o que, conseqüentemente, pode aumentar a
300 chance de contato de animais e humanos com hospedeiros infectados (Figura 3).

301 Nossos resultados destacam as prevalências de *A. cantonensis* em diferentes
302 espécies de hospedeiros intermediários na Bahia, contribuindo para o estado da arte
303 deste parasita nesta região, onde os dados ainda são incipientes (Carvalho et al., 2012;
304 Morassutti et al., 2014). Além disso, a riqueza elevada de reservatórios intermediários
305 positivos, com a co-ocorrência de mais de uma espécie infectada com *A. cantonensis* em
306 um mesmo ponto de coleta, faz com que seja ampliada a chance de desenvolvimento da
307 larva para a fase infectante, promovendo uma disseminação contínua (Wallace 1996;
308 Simões et al, 2014). O esforço amostral, além de ter sido relevante em determinar a
309 chance de encontrar a maioria das espécies de moluscos identificadas, foi possivelmente
310 associado a maior chance de encontrar moluscos infectados por *A. cantonensis*: a
311 maioria das infecções estão concentradas em mais de dois dias de amostragem. Dessa
312 forma, este estudo destaca a necessidade de se levar em consideração o esforço amostral

313 em desenhos de estudos epidemiológicos de *A. cantonensis*. Adicionalmente, cabe
314 destacar que este foi o primeiro trabalho em que fatores de risco são avaliados para as
315 espécies de moluscos terrestres potenciais hospedeiros de *A. cantonensis*, o que,
316 futuramente, pode servir para fundamentar estratégias de controle.

317

318 **Conclusão**

319 A riqueza elevada e a ampla distribuição das espécies na área de estudo sugerem
320 que maior atenção seja voltada aos riscos prováveis de infecção por *A. cantonensis* para
321 residentes das comunidades populares urbanas. Prevalência de infecção em diferentes
322 espécies no ambiente urbano sugere um potencial risco para os residentes, de forma que
323 medidas sistemáticas de controle e manejo a fim de reduzir o potencial risco aos
324 humanos devem ser avaliadas. Com este estudo foi possível destacar que em apenas
325 mais um dia de esforço no levantamento de dados de infestação de caramujos e lesmas é
326 significativo, fornecendo dados para o controle de moluscos terrestres o que pode
327 direcionar melhores esforços para controle das diferentes espécies hospedeiros do
328 parasita *A. cantonensis*. Os potenciais fatores de riscos estão intimamente relacionados
329 com a presença de água, sejam por meio de água corrente disposta no ambiente e/ou
330 água oriunda das chuvas, essas condições somadas às outras características ambientais,
331 por exemplo, um solo mais permeável, vegetação contribuem direta ou indiretamente
332 para o estabelecimento, distribuição e sobrevivência das populações de moluscos
333 terrestres em diferentes ambientes. Essas condições contribuem para o aumento do
334 número de animais contaminados pelo helminto *A. cantonensis*, trazendo assim
335 possíveis riscos de infecção para a população residente. Estudos sorológicos
336 retrospectivos e prospectivos em humanos fazem-se necessário na área de estudo para

337 identificação de anticorpos na população residente que estão em estreito contato com os
338 reservatórios final e intermediários de *A. cantonensis*. Estes resultados fornecem dados
339 das espécies alvos para o controle de zoonoses, principalmente no que se refere a
340 meningite eosinofílica. Esta doença, apesar de não haver casos registrados para a Bahia,
341 ainda é uma doença negligenciada em todo mundo e muitos casos podem ser
342 confundidos por outras patologias (Fitch et al, 2007; Waghdhare et al., 2010).

343

344

345 **Referências**

346

347 American, P., & Bureau, S. (1968). for the Identification of the Snail
348 Intermediate Hosts of in the Americas Guide for the Identification of the Snail
349 Intermediate Hosts of Schistosomiasis in, 3.

350 Astor, T., von Proschwitz, T., Strengbom, J., Berg, M. P., & Bengtsson, J.
351 (2017). Importance of environmental and spatial components for species and trait
352 composition in terrestrial snail communities. *Journal of Biogeography*, 44(6), 1362–
353 1372. <https://doi.org/10.1111/jbi.12946>.

354 Barbosa, F. S. (1995). Tópicos em malacologia médica.

355 Barratt, J., Chan, D., Sandaradura, I., Malik, R., Spielman, D., Lee, R., Stark, D.
356 (2016). *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and
357 clinical significance as a human pathogen. *Parasitology*, 143(9), 1087–1118.

358 Bradley, C. A., & Altizer, S. (2007). Urbanization and the ecology of wildlife
359 diseases. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(2), 95–102.

360 Breure, A. S. H., & Ablett, J. D. (2014). Annotated type catalogue of the
361 Bulimulidae (Mollusca, Gastropoda, Orthalicoidea) in the natural history museum,
362 London. *ZooKeys*, 392, 1–367.

363 Brodie, G., & Barker, G. M. (2011). Introduced land snails in the Fiji Islands :
364 are there risks involved ? *Island Invasives: Eradication and Management*. IUCN, Gland,
365 Switzerland., 32–36.

366 Bros, V., Torre, I., & Santos, X. (2016). Uncovering the environmental factors that
367 influence diversity patterns of Mediterranean terrestrial Gastropod communities: a
368 useful tool for conservation. *Ecological Research*, 31(1), 39–47.

369 Chaves, L. F., Hamer, G. L., Walker, E. D., Brown, W. M., Ruiz, M. O., &
370 Kitron, U. D. (2011). Climatic variability and landscape heterogeneity impact urban
371 mosquito diversity and vector abundance and infection. *Ecosphere*, 2(6), art70.

372 Chikweto, A., Bhaiyat, M. I., Macpherson, C. N. L., DeAllie, C., Pinckney, R.
373 D., Richards, C., & Sharma, R. N. (2009). Existence of *Angiostrongylus cantonensis* in
374 rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. *Veterinary Parasitology*, 162(1–2),
375 160–162.

376 Colley, E. (2012). Moluscos terrestres e a malacologia paranaense: historico e
377 importância no cenário nacional. *Estudos de Biologia*, 34(303), 75.

378 Costa, F., Porter, F. H., Rodrigues, G., Farias, H., de Faria, M. T., Wunder, E.
379 A., Childs, J. E. (2014). Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and
380 *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum
381 environment in Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.), 14(1),
382 33–40.

383 Cowie, R. H. (2013). Biology, systematics, life cycle, and distribution of
384 *Angiostrongylus cantonensis*, the cause of rat lungworm disease. *Hawaii J. Med. Public*
385 *Health*, 72(6 Suppl 2), 6–9.

386 Crawford-Sidebotham, T. J. (1972). The influence of weather upon the activity
387 of slugs. *Oecologia*, 9(2), 141–154.

388 Df, B. (2008). Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância
389 Epidemiológica 2a edição Série A . Normas e Manuais Técnicos.

390 Df, B. (2008). Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância
391 Epidemiológica 2a edição Série A . Normas e Manuais Técnicos.

392 Dias, R. J. P., Bessa, E. C. D. A., & D'Ávila, S. (2007). Influence of substrate
393 humidity on desiccation resistance capacity in *Subulina octona* (Mollusca, Subulinidae).
394 *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1), 137–139.

395 Eamsobhana, P. (2014). Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus*
396 *cantonensis*-a neglected disease with escalating importance. *Tropical Biomedicine*,
397 31(4), 569–578.

398 Espírito-Santo, M. C. C. do, Pinto, P. L. S., Mota, D. J. G. da, & Gryscek, R. C.
399 B. (2013). The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis
400 diagnosed in the city of são paulo, brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de*
401 *São Paulo*, 55(2), 129–132.

402 Fitch, M. T., & van de Beek, D. (2007). Emergency diagnosis and treatment of
403 adult meningitis. *Lancet Infectious Diseases*, 7(3), 191–200.

404 Gomes, S. R., & Thomé, J. W. (2004). Diversity and distribution of the
405 Veronicellidae (Gastropoda: Soleolifera) in the Oriental and Australian biogeographical
406 regions. *Memoirs of the Queensland Museum*, 49(2), 589–601.

407 Graeff-Teixeira, C., Da Silva, A. C. A., & Yoshimura, K. (2009). Update on
408 eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clinical Microbiology*
409 *Reviews*, 22(2), 322–348.

410 Helm, J. R., Morgan, E. R., Jackson, M. W., Wotton, P., & Bell, R. (2010).
411 Canine angiostrongylosis: An emerging disease in Europe. *Journal of Veterinary*
412 *Emergency and Critical Care*, 20(1), 98–109.

413 Hochberg, N. S., Blackburn, B. G., Park, S. Y., Sejvar, J. J., Effler, P. V., &
414 Herwaldt, B. L. (2011). Eosinophilic meningitis attributable to *Angiostrongylus*
415 *cantonensis* infection in Hawaii: Clinical characteristics and potential exposures.
416 *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(4), 685–690.

417 Hochberg, N. S., Blackburn, B. G., Park, S. Y., Sejvar, J. J., Effler, P. V., &
418 Herwaldt, B. L. (2011). Eosinophilic meningitis attributable to *Angiostrongylus*
419 *cantonensis* infection in Hawaii: Clinical characteristics and potential exposures.
420 *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(4), 685–690.

421 Hoffmann, M. H., Meng, S., Kosachev, P. A., Terechina, T. A., & Silanteva, M.
422 M. (2011). Land snail faunas along an environmental gradient in the Altai Mountains
423 (Russia). *Journal of Molluscan Studies*, 77(1), 76–86.

424 Hollingsworth, R. G., Kaneta, R., Sullivan, F. F., Bishop, H. S., Qvarnstrom, Y.,
425 daSilva, A. J., & Robinson, D. G. (2007). Distribution of *Parmarion cf. martensi*
426 (Pulmonata: Helicarionidae), a new semi-slug pest on Hawai'i Island, and its potential
427 as a vector for human angiostrongyliasis. *Pac.Sci.*, 61(4), 457–467.

428 Hurvich, C. M., Tsai, C-L. (1989). Regression and Time Series Model Selection
429 in Small Samples. *Biometrika* 76, 297-307.

430 Hylander, K., Nilsson, C., Jonsson, B. G., Göthner, T., Gunnar, B., & Gothner,
431 T. (2014). Differences in Habitat Quality Explain Nestedness in a Land Snail Meta-

432 Community in habitat Differences in a land snail quality explain nestedness meta-
433 community. *Oikos*, 108(July 2004), 351–361.

434 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2010. URL
435 <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopseporsetores/?nivel=st>, last accessed in the 11th
436 of February 2017.

437 Jezewski, W., Buńkowska-Gawlik, K., Hildebrand, J., Perek-Matysiak, A., &
438 Laskowski, Z. (2013). Intermediate and paratenic hosts in the life cycle of
439 *Aelurostrongylus abstrusus* in natural environment. *Veterinary Parasitology*, 198(3–4),
440 401–405.

441 Kikuti M, Cunha GM, Paploski IAD, Kasper AM, Silva MMO, Tavares AS, et
442 al. (2015) Spatial Distribution of Dengue in a Brazilian Urban Slum Setting: Role of
443 Socioeconomic Gradient in Disease Risk. *PLoS Negl Trop Dis* 9(7): e0003937.

444 Labaune, C., & Magnin, F. (2001). Land snail communities in Mediterranean
445 upland grasslands: The relative importance of four sets of environmental and spatial
446 variables. *Journal of Molluscan Studies*, 67(2), 463–474.

447 Lv, S., Zhang, Y., Liu, H.-X., Hu, L., Yang, K., Steinmann, P., ... Zhou, X.-N.
448 (2009). Invasive snails and an emerging infectious disease: results from the first
449 national survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Neglected Tropical*
450 *Diseases*, 3(2), e368.

451 Morassutti, A. L., Thiengo, S. C., Fernandez, M., Sawanyawisuth, K., & Graeff-
452 Teixeira, C. (2014). Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*:
453 An emergent disease in Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(4), 399–407.

454 Nunes, G. K. M., & Santos, S. B. (2012). Environmental factors affecting the
455 distribution of land snails in the Atlantic Rain Forest of Ilha Grande, Angra dos Reis,
456 RJ, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 72(1), 79–86.

457 Oehler, E., Ghawche, F., Delattre, A., Berberian, A., Levy, M., & Valour, F.
458 (2014). *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis: A clinical study of 42
459 consecutive cases in French Polynesia. *Parasitology International*, 63(3), 544–549.

460 Pien, F. D., & Pien, B. C. (1999). *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic
461 meningitis. *International Journal of Infectious Diseases*, 3(3), 161–163.

462 Rodelo-Urrego, M., Pagán, I., González-Jara, P., Betancourt, M., Moreno-
463 Letelier, A., Ayllón, M. A., García-Arenal, F. (2013). Landscape heterogeneity shapes
464 host-parasite interactions and results in apparent plant-virus codivergence. *Molecular*
465 *Ecology*, 22(8), 2325–2340.

466 Rugai, E., Mattos, T., Brisola, A. P. (1954). Nova técnica para isolar larvas de
467 nematóides das fezes: modificação do método de Baermann. *Revista Do Instituto*
468 *Adolfo Lutz*, 14(1), 1–8.

469 Salgado, N. C., & Dos Santos Coelho, A. C. (2003). Moluscos terrestres do
470 Brasil (Gastropodes operculados ou nao, exclusive Veronicellidae, Milacidae e
471 Limacidae). *Revista de Biologia Tropical*, 51(SUPPL. 3), 149–189.

472 Santos-Carvalho, O., Scholte, R. G. C., de Mendonça, C. L. F., Passos, L. K. J.,
473 & Caldeira, R. L. (2012). *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea)
474 in molluscs from harbour areas in Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(6),
475 740–746.

476 Sawanyawisuth, K., & Chotmongkol, V. (2013). Eosinophilic meningitis.
477 *Handbook of Clinical Neurology*, 114, 207–215.

478 Simião, M. S., & Fischer, M. L. (2004). Estimativa e inferências do método de
479 controle do molusco exótico *Achatina fulica* BOWDICH 1822 (
480 STILOMMATOPHORA ; ACHATINIDAE) em Pontal do Paraná , Litoral do Estado
481 do Paraná. *Cadernos de Biodiversidade*, 4(2), 74–83.

482 Simões, R. O., Júnior, A., Olifiers, N., Garcia, J. S., Bertolino, A. V. F., &
483 Luque, J. L. (2014). A longitudinal study of *Angiostrongylus cantonensis* in an urban
484 population of *Rattus norvegicus* in Brazil: the influences of seasonality and host
485 features on the pattern of infection. *Parasites & Vectors*, 7(1), 100.

486 Sólymos, P., Farkas, R., Kemencei, Z., Páll-Gergely, B., Vilisics, F., Nagy, A.,
487 Hornung, E. (2009). Micro-habitat scale survey of land snails in dolines of the Alsó-
488 hegy , Aggtelek National Park , Hungary. *Mollusca*, 27(2), 167–171.

489 Su, M., Li, W., Li, Z., Zhang, F., & Hui, C. (2009). The effect of landscape
490 heterogeneity on host-parasite dynamics. *Ecological Research*, 24(4), 889–896.

491 Teem, J. L., Qvarnstrom, Y., Bishop, H. S., da Silva, A. J., Carter, J., White-
492 McLean, J., & Smith, T. (2013). The occurrence of the rat lungworm, *Angiostrongylus*
493 *cantonensis*, in nonindigenous snails in the Gulf of Mexico region of the United States.
494 *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health : A Journal of Asia Pacific Medicine &*
495 *Public Health*, 72(6 Suppl 2), 11–4.

496 Teles, H. M. S., Vaz, J. F., Fontes, L. R., & Domingos, M. D. F. (1997).
497 Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil:
498 Caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. *Revista de Saude Publica*,
499 31(3), 310–312.

500 Thiengo, S. C., Faraco, F. A., Salgado, N. C., Cowie, R. H., & Fernandez, M. A.
501 (2007). Rapid spread of an invasive snail in South America: The giant African snail,
502 *Achatina fulica*, in Brasil. *Biological Invasions*, 9(6), 693–702.

503 Toma, H., Matsumura, S., Oshiro, C., Hidaka, T., & Sato, Y. (2002). Ocular
504 angiostrongyliasis without meningitis symptoms in Okinawa, Japan. *J Parasitol*, 88(1),
505 211–213.

506 Waghdhare, S., Kalantri, A., Joshi, R., & Kalantri, S. (2010). Accuracy of
507 physical signs for detecting meningitis: A hospital-based diagnostic accuracy study.
508 *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 112(9), 752–757.

509 Wang, Q. P., Lai, D. H., Zhu, X. Q., Chen, X. G., & Lun, Z. R. (2008). Human
510 angiostrongyliasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(10), 621–630.

511 Wang, Q. P., Wu, Z. D., Wei, J., Owen, R. L., & Lun, Z. R. (2012). Human
512 *Angiostrongylus cantonensis*: An update. *European Journal of Clinical Microbiology*
513 *and Infectious Diseases*, 31(4), 389–395.

514 WEBLEY, D. (1964). Slug relation weather. *Ann. Appl. Biol.*, 53, 407–414.

515

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Prevalência e abundância de moluscos terrestres.

Espécie	n pontos presença de caramujo	Prevalência caramujo ((ponto caramujo presente/ponto)*100)	Abundância total (n. de indivíduos) (IQR*)**	Abundância caramujos ($\mu \pm \sigma$ caramujos por ponto)
<i>Subulina octona</i>	19	47.5	278(1,20-0,94)	14.63±16.13
<i>Sarasinula marginata</i>	12	30.0	69(3,50-2,22)	5.75±6.42
<i>Achatina fulica</i>	9	22.5	96(5,50-3,50)	10.66±13.55
<i>Bulimulus</i> sp	9	22.5	45(1,35-0,62)	5.00±2.95
<i>Bradybaena similares</i>	7	17.5	42(1,50-0,96)	5.85±7.71
<i>Drymaeus papyraceus</i>	6	15.0	31(2,50-1,69)	5.16±3.65
Streptaxidae	2	5.0	6(2,97-1,92)	3.00±2.82
<i>Helicina</i> sp	2	5.0	10(0,70-0,50)	5.00±5.65
Total de Pontos (n = 40)				

*IQR, intervalo interquartil; **Intervalo interquartil do tamanho corporal das espécies de moluscos terrestres encontrados na área de estudo.

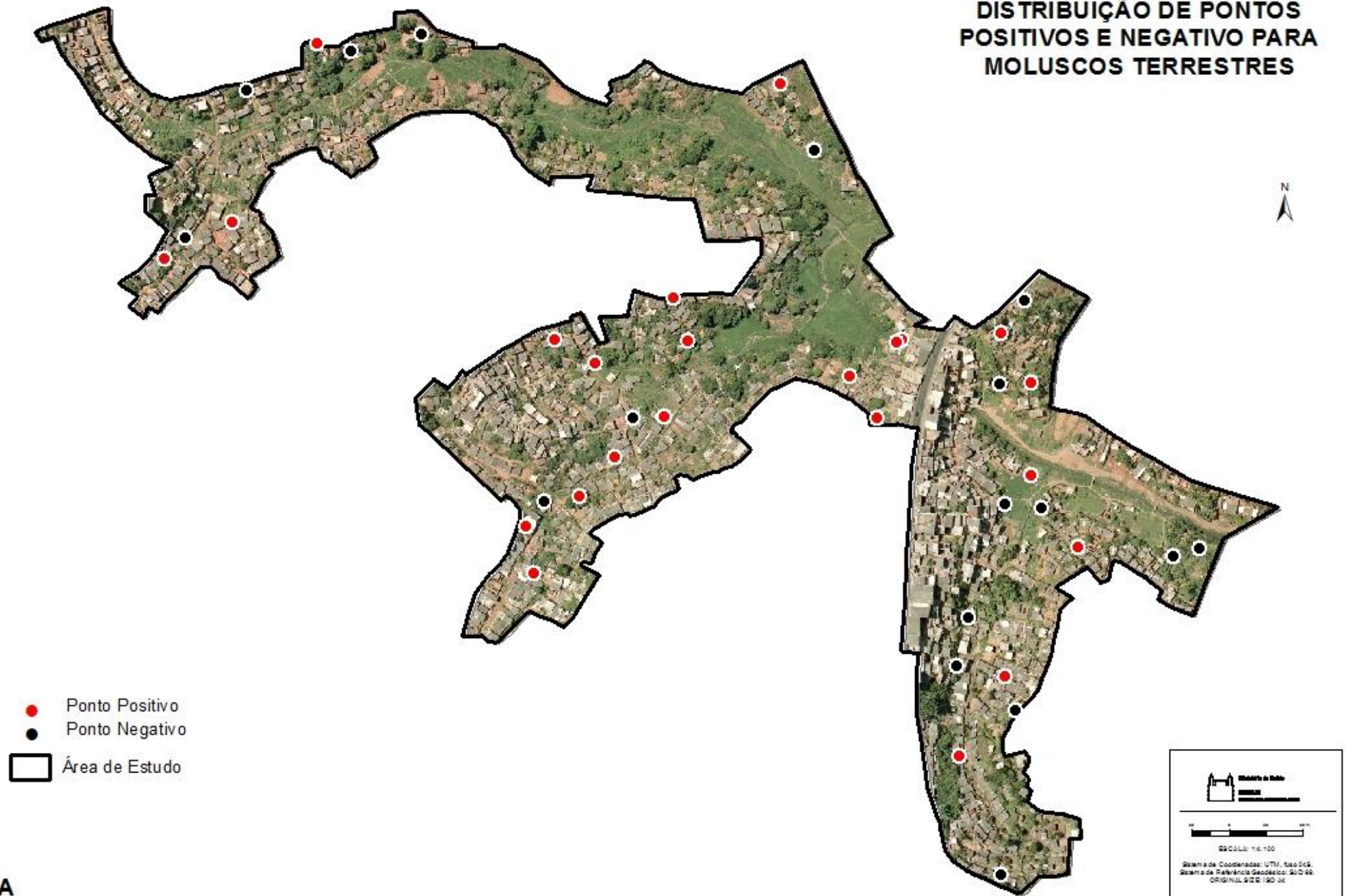
Tabela 2. Análise morfológica e molecular das larvas coletadas em moluscos terrestres.

Espécie	n. larvas	Morfologia			Similaridade com cepa referencia de <i>A.</i> <i>cantonensis</i>	Estágio larval (L2)	Diagnóstico
		metastrongilídeo	não metastrongilídeo	n			
<i>Achatina fulica</i>	104	68	36	11	100%	32	<i>A. cantonensis</i>
<i>Sarasinula marginata</i>	12	4	8	-	-	4	<i>A. cantonensis</i>
<i>Subulina octona</i>	47	3	44	-	-	3	<i>A. cantonensis</i> + outro
<i>Bulimulus sp</i>	15	2	13	-	-	1	<i>A. cantonensis</i> + outro

Tabela 3. Descritivo da abundancia e prevalência (%) de *Angiotrongylus sp.* por ponto.

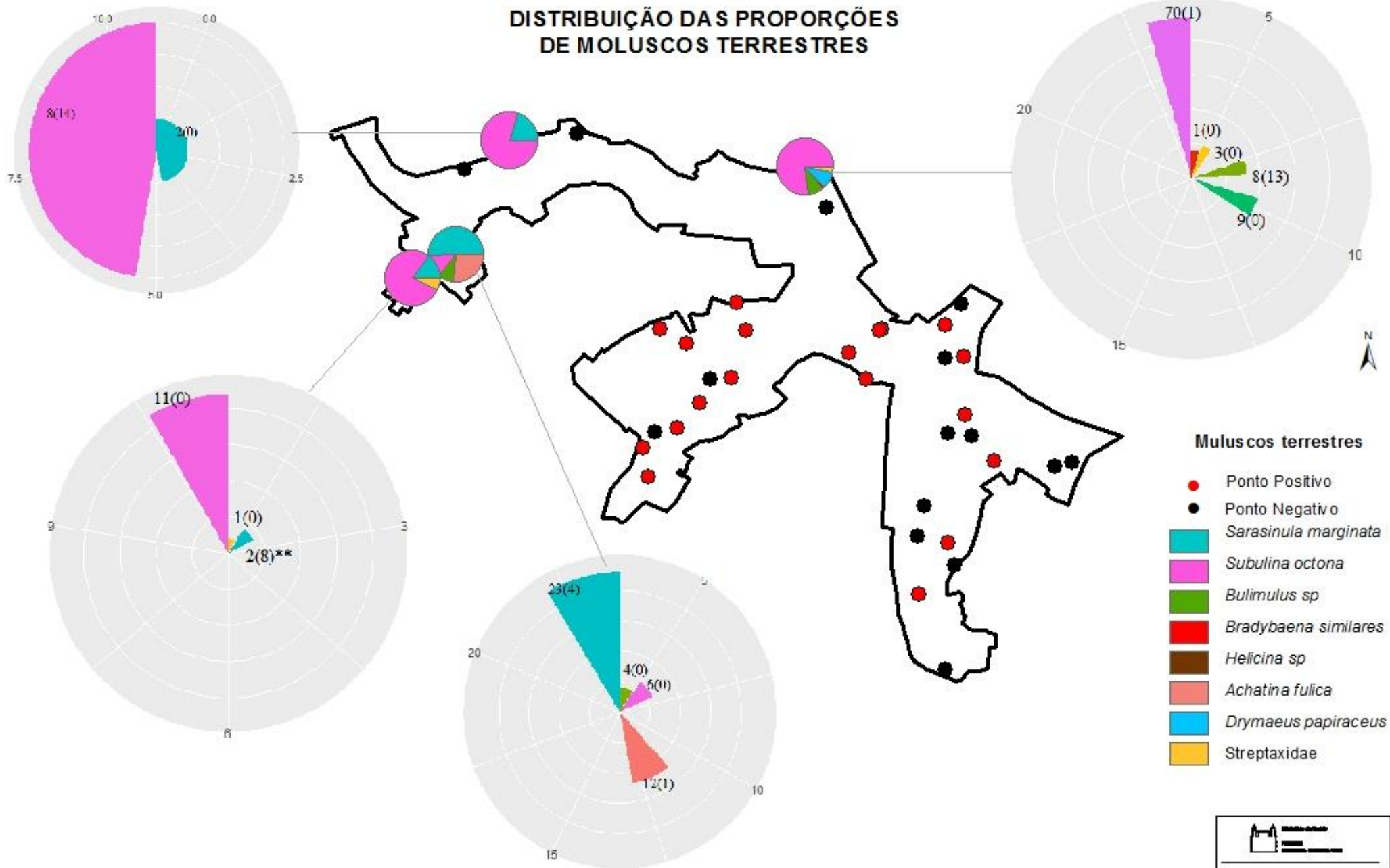
Espécie	n de positivos para larvas/ponto positivo caramujo	qtde.		Ponto positivo de <i>A.</i>		Intensidade de
		%	larvas	<i>cantonensis</i> /Biomol	%	infecção por <i>A.</i> <i>cantonensis</i>
<i>Achatina fulica</i>	4	44	104	3	33	22.66±22.54
<i>Sarasinula marginata</i>	1	8	12	1	8	4
<i>Subulina octona</i>	4	21	47	1	5	0.3
<i>Bulimulus sp</i>	2	22	15	1	11	0.5

DISTRIBUIÇÃO DE PONTOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA MOLUSCOS TERRESTRES

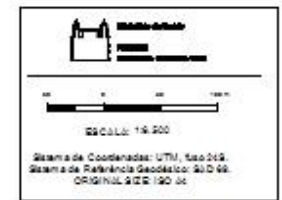


A

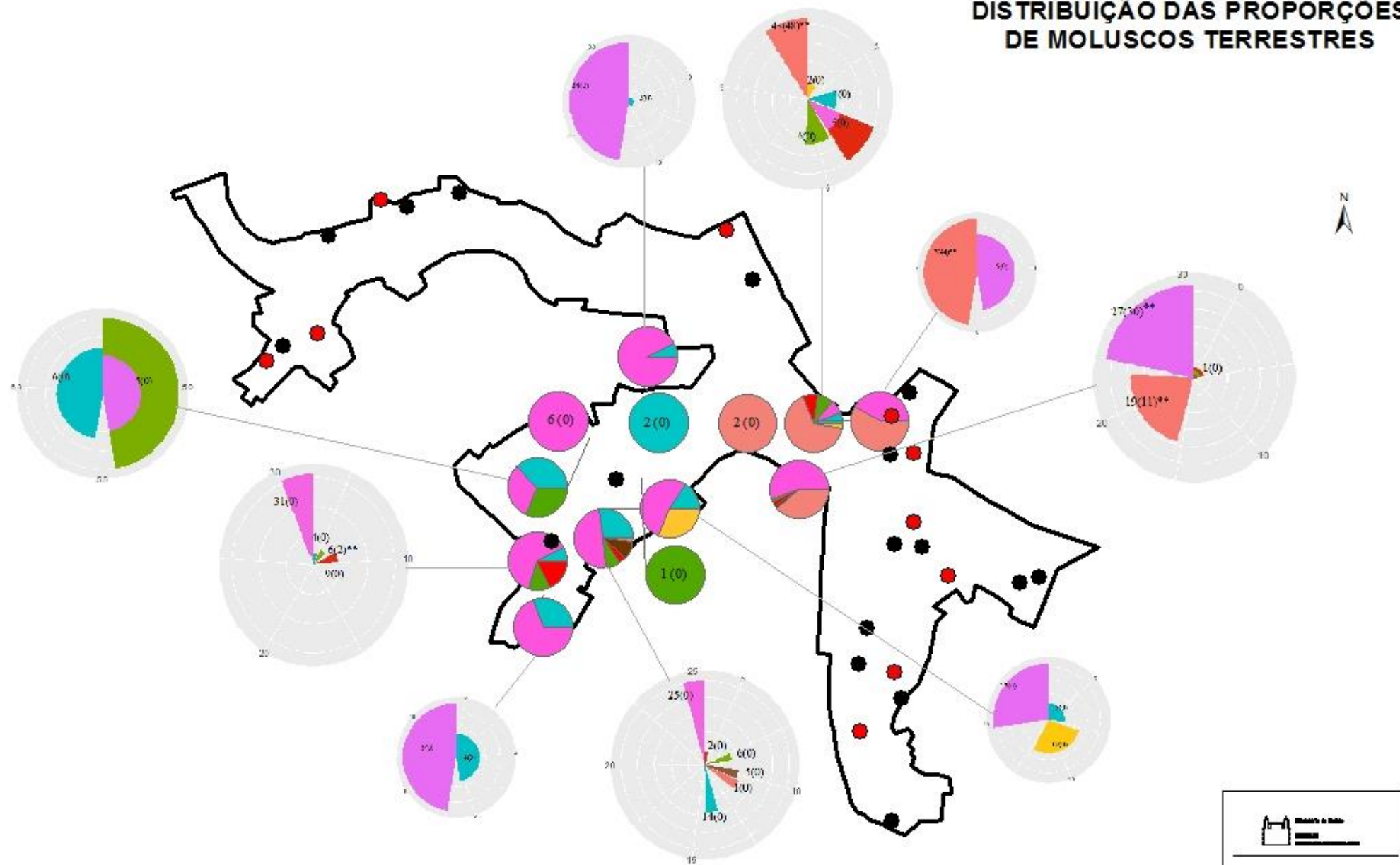
DISTRIBUIÇÃO DAS PROPORÇÕES DE MOLUSCOS TERRESTRES



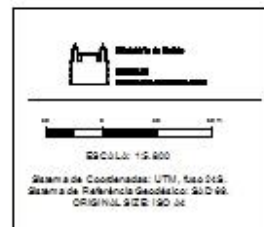
B



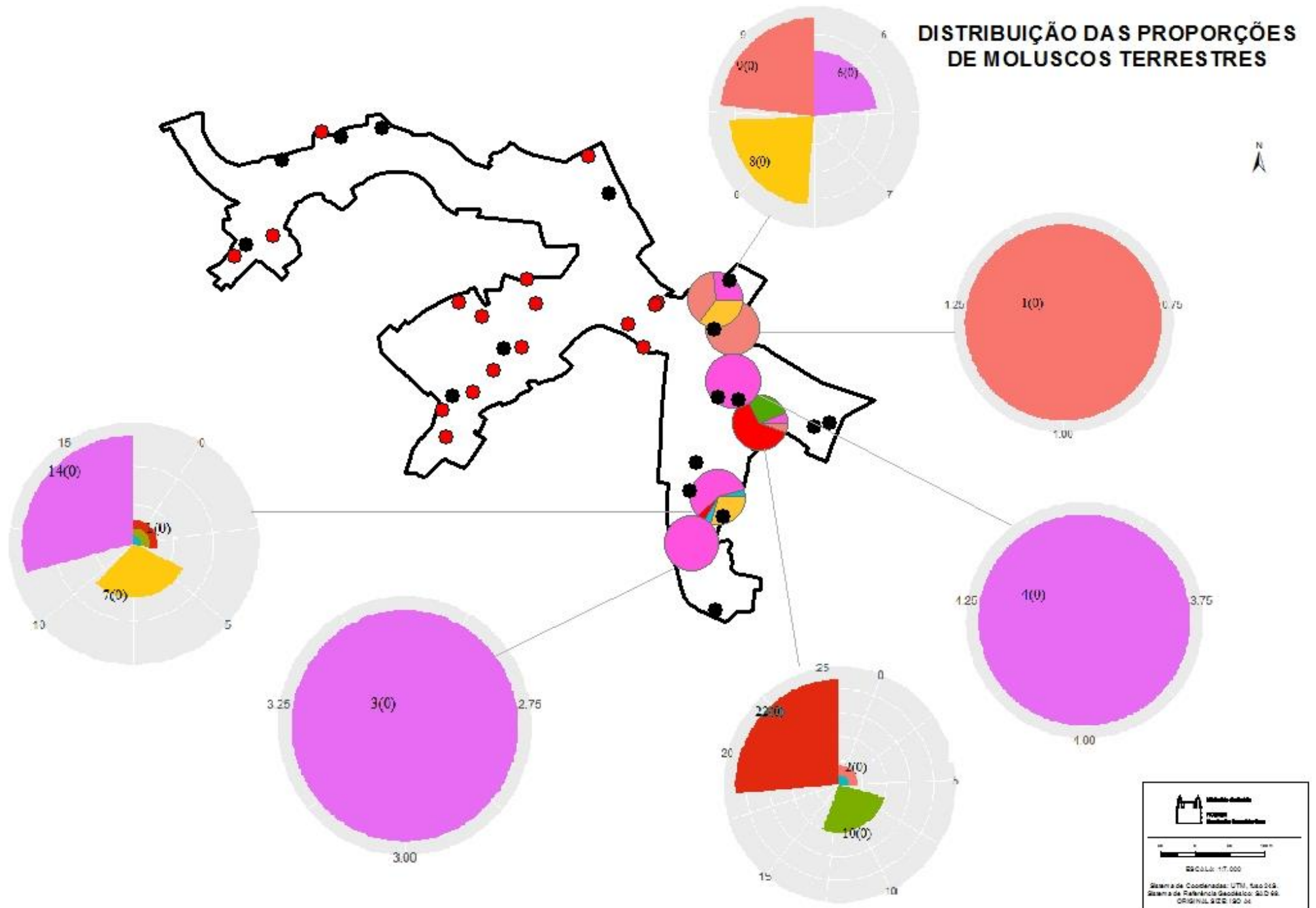
DISTRIBUIÇÃO DAS PROPORÇÕES DE MOLUSCOS TERRESTRES



C



DISTRIBUIÇÃO DAS PROPORÇÕES DE MOLUSCOS TERRESTRES



D

Figura 2- Mapa da área de estudo com os pontos amostrados, considerando a presença e ausência de moluscos terrestres (A). Proporção e abundância de moluscos terrestres por pontos de amostragem, agrupados por vale, vales 1, 2 e 3 em (B), (C) e (D), respectivamente. As abundâncias representadas nos mapas foram analisadas por ponto de coleta, em que cada escala do gráfico varia de um valor mínimo (zero) ao valor máximo de indivíduos encontrados em cada ponto. Os valores entre parênteses representam o número de larvas extraídas de cada espécie de molusco encontrada. A confirmação da presença de *A. cantonensis* no ponto de amostragem e a espécie onde foi encontrada este helminto é representada por (**).

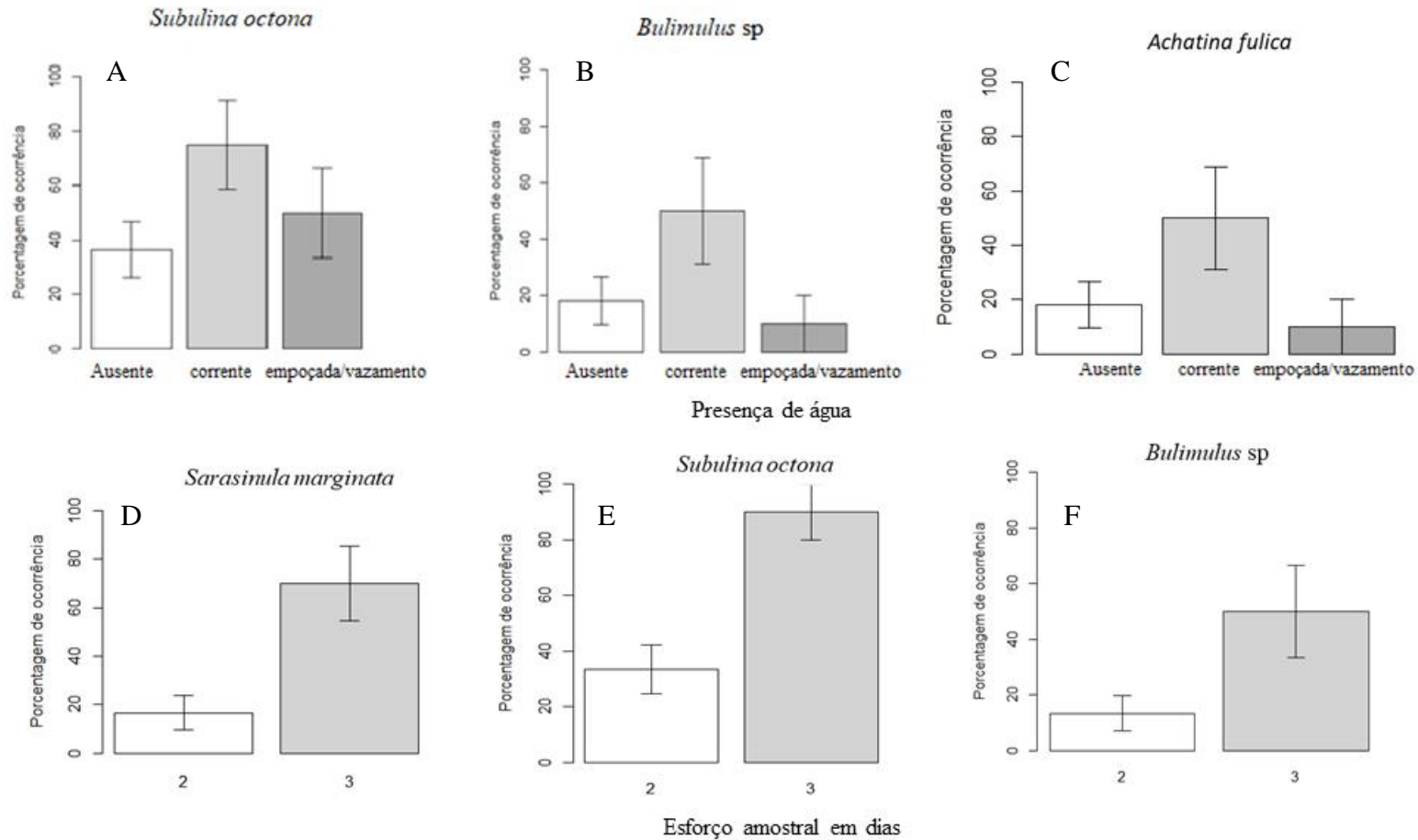


Figura 2- Boxplots da porcentagem de ocorrência de *Subulina octona* (A), *Bulimulus sp* (B) e *Achatina fulica* (C) pela presença de água (A-C); e a porcentagem de ocorrência de *S. marginata* (D), *Subulina octona* (E) e *Bulimulus sp* (F) por esforço amostral em dias (D-F).

Tabela 4- Modelos probabilístico univariado, multivariado e seleção de modelos (glm, family=binomial negativa) associado aos fatores de riscos associados a população de moluscos terrestres.

Modelos de probabilidade de presença de moluscos terrestres							
Espécie	Variável	Não ajustado OR (95% IC)	Ajustado OR (95% IC)	Seleção de modelo Modelo	AICc	Δ AIC	wi
<i>Sarasilula Marginata</i>	<u>Esforço amostral (dias)</u>	11,67(IC 95%: 2,42-71,45) *	–	i.y ~ esforço amostral	46,6	0,00	0,97
				ii.y~1	51,0	7,40	0,02
<i>Achatina fulica</i>	<u>Água</u>						
	Ausente	Referência	–	i.y~1	44,8	0,00	0,54
	Empoçada/vazamento	0,50 (IC 95%: 0,02-4,04)	–	ii.y ~ água	45,1	0,36	0,45
	Corrente	4,50 (IC 95%: 0,78-28,43)#	–				
<i>Subulina octona</i>	<u>Água</u>						
	Ausente	Referência	–	i.y ~ esforço amostral	49,0	0,00	0,53
	Empoçada/vazamento	1,75(IC 95%:0,38-8,24)	3,70(IC 95%:0,64-25,00)	ii.y~água+esforço amostral	49,3	0,33	0,45
	Corrente	5,25(IC 95%:0,95-42,13)#	7,23(IC 95%:0,96-76,09)	iii.y~1	57,5	8,44	>0,01
	<u>Esforço amostral (dias)</u>	18,0(IC 95%: 2,82-356,67)*	26,26(IC 95%: 3,44-585,21)*				
<i>Bulimulus sp</i>	<u>Água</u>						
	Ausente	Referência		i.y ~ esforço amostral	41,7	0,00	0,60
	Empoçada/vazamento	0,50(IC 95%: 0,02-4,04)	0,73(IC 95%: 0,03-7,30)	ii.y~água+esforço amostral	43,4	1,69	0,26
	Corrente	4,5(IC 95%: 0,78-28,43)#	4,73(IC 95%: 0,71-37,39)	iii.y~1	44,8	3,01	0,13
	<u>Esforço amostral (dias)</u>	6,5(IC 95%: 1,31-36,7)*	5,98(IC 95%: 1,07-39,05)*				

#0,05<p≤0,10;*p<0,05; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança.

Tabela 5- Modelos de intensidade univariados, multivariados e seleção de modelos (glm, family=binomial negativa) associado aos fatores de riscos associados a população de moluscos terrestres.

Modelos de intensidade de moluscos terrestres

Espécie	Variável	Não ajustado Taxa (95% IC)	Ajustado Taxa (95% IC)	Seleção de modelo Modelo	AICc	Δ AIC	wi
<i>Sarasinula marginata</i>	<u>Água</u>						
	Ausente	Referência		i.y~ água	65,9	0,00	0,91
	Empoçada/vazamento	1,25(IC 95%: 0,5-3,01)	1,85(IC 95%: 0,23-18,59)	ii.y~ água+esgoto aberto	72	6,11	0,04
	Corrente	5,37(IC 95%: 2,7-11,12)*	8.54(IC 95%: 0,71-128,31)	iii.y~1	72,3	6,37	0,03
	<u>Tipo de substrato (solo)</u>			iv.y~ água+materiais de construção + esgoto aberto	80,7	14,8	>0,01
	Parcialmente-permeável	Referência		v.y ~ água+tipo de substrato+esgoto aberto+materiais de construção	93,8	27,9	0
	Permeável	3,08(IC 95%: 1,20-8,00)*					
	<u>Esgoto aberto (5 m)</u>	2,81(IC 95%: 1,08-7,34)*					
<u>Materiais de construção</u>	3,43(IC 95%: 1,53-7,92)*						
<i>Achatina fulica</i>	<u>Água</u>						
	Ausente	Referência		i.y~1	53,6	0,00	0,95
	Empoçada/vazamento	12,29(IC 95%: 3,03-71,59)*		ii.y~ água+ esforço amostral	60,7	7,17	0,03
	Corrente	2,79(IC 95%: 0,95-8,32)#		iii.y~ esforço amostral	60,7	7,17	0,03
	<u>Entulho</u>	0,35(IC 95%: 0,09-1,14)#		iv.y~ água+umidade+esforço amostral	78,7	25,1	0
	<u>Esforço amostral (dias)</u>	6,75(IC 95%: 2,49-19,04)*		v.y ~ água+entulho+ esforço amostral+umidade	134	81,9	0
	<u>Umidade</u>	1,19(IC 95%: 1,07-1,34)*					
<i>Subulina octona</i>	<u>Tipo de substrato (solo)</u>						
	Parcialmente-permeável	Referência		i.y~chuva acumulada	121	0,00	0,84
	Permeável	0,54(IC 95%: 0,28-1,02)#		ii.y~ vegetação+chuva acumulada	125	4,38	0,09
	<u>Vegetação</u>			iii.y~ 1	127	5,96	0,04
	Ausente	Referência		iv.y ~ tipo de substrato+vegetação+chuva acumulada	129	8,24	0,01
	Herbácea	1,68(IC 95%: 0,69-3,88)					
	Arbusto	2,34(IC 95%: 0,91-5,97)#					
<u>Chuva acumulada</u>	1,47(IC 95%: 1,17-1,88)*	1,32(IC 95%: 0,95-1,81)					

#0,05<p≤0,10; *p<0,05; IC, Intervalo de Confiança

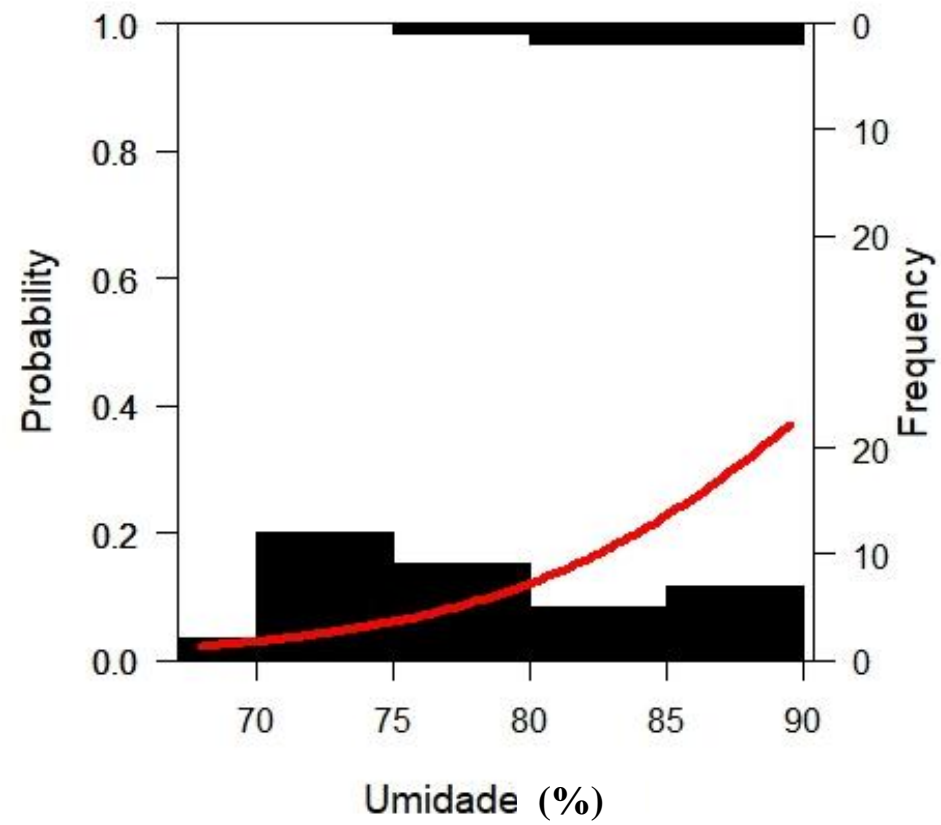


Figura 3- Relação entre a probabilidade de presença de *A. cantonensis* pela umidade.

Material suplementar

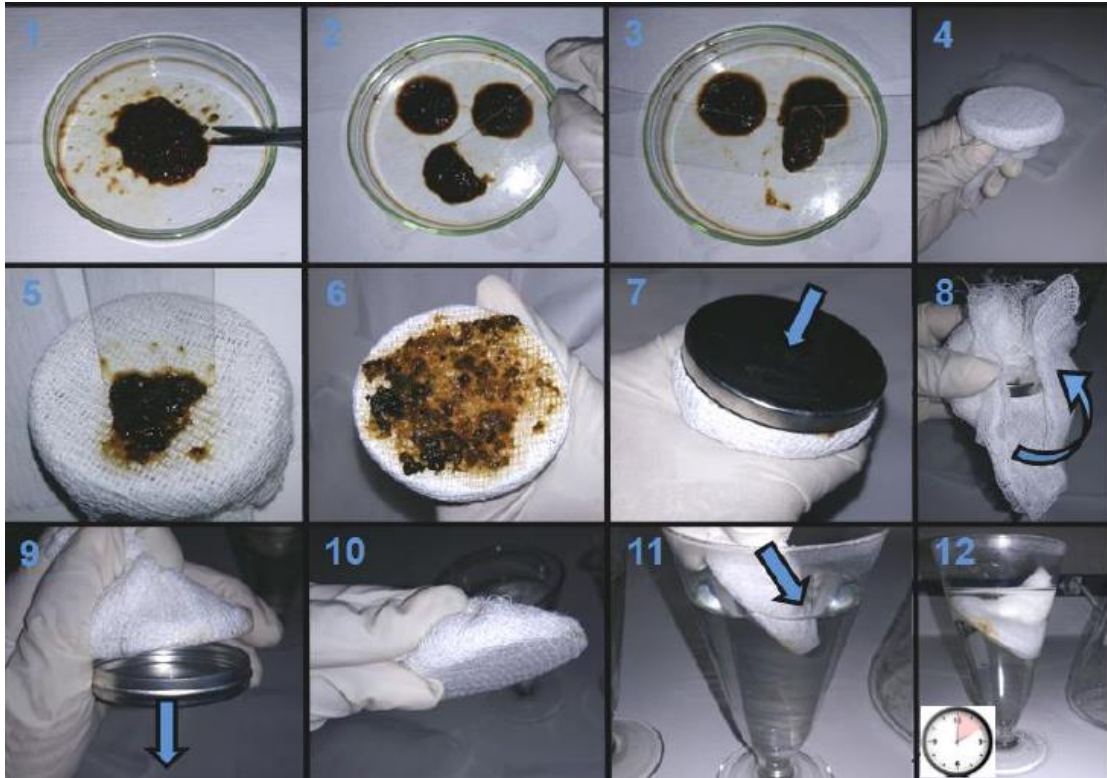


Figura S1- Técnica do Rugai modificado.

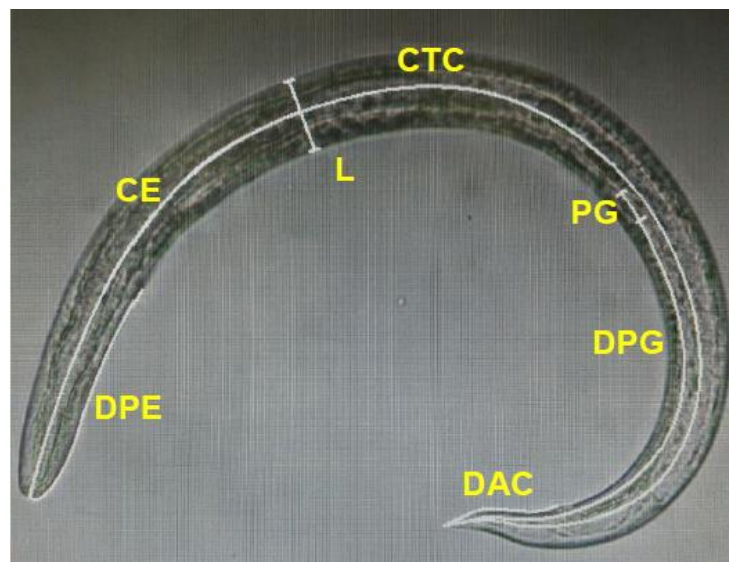


Figura S2- Morfometria de larvas de *Angiostrongylus*. CTC – comprimento total do corpo, L – largura em nível do esôfago, CE – comprimento do esôfago, DPE – distância do poro excretor a anterior, PG – primórdio genital (comprimento), DPG – distância do primórdio genital a cauda (a partir do meio da estrutura), DAC – distância ânus a cauda.

Tabela Suplementar S1: Variáveis ambientais coletadas durante a coletas dos moluscos terrestres. Essas variáveis foram testadas como fatores de risco independentes nos modelos GLM de probabilidade e intensidade das espécies de moluscos terrestres, assim como a propabilidade e intensidade de infecção por *A. cantonensis*.

Variável	Tipo	Nível
Fezes de rato	Binomial	Presença/Ausência
Trilhas	Binomial	Presença/Ausência
Toca	Contínua	Número de tocas de ratos
Árvore	Contínua	Número de árvore
Lixo	Binomial	Presença/Ausência
Água	Categórico	Ausente Empoçada/vazamento Corrente
Tipo de substrato (solo)	Categórico	Permeável Parcialmente-permeável
Esgoto aberto (5 m)	Binomial	Presença/Ausência
Vegetação	Categórico	Ausente Herbácea Arbusto
Entulho	Binomial	Presença/Ausência
Materiais de construção	Binomial	Presença/Ausência
Esforço amostral	Categórico	2 dias 3 dias
Chuva acumulada ^a	Contínua	Chuva acumulada media por semana de coleta em milimetro.
Umidade relativa ^a	Contínua	Umidade média relativa em porcentagem.

^a Dados obtidos da estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia