

Caracterização morfológica e morfométrica de estágios larvares de *Strongyloides* spp., ancilostomídeos e *Angiostrongylus* spp.: subsídios para identificação em amostras ambientais

Morphological and morphometric characterization of larval stages of *Strongyloides* spp., hookworms and *Angiostrongylus* spp.: subsidies for identification in environmental samples

Lais Fernanda de Pauli-Yamada^{1*} , Pedro Luiz Silva Pinto² 

¹ Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

² Núcleo de Enteroparasitas, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: lais.yamada@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 10.02.2023 – Aceito/Accepted: 10.05.2023

RESUMO

A identificação precisa de nematódeos de interesse médico-veterinário em amostras de solo ou alimentos é uma ação complexa, devido à grande diversidade de nematódeos no ambiente. O objetivo do estudo foi realizar a caracterização morfológica e morfométrica de diferentes estágios larvários de ancilostomídeos, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides venezuelensis*, *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*, e desenvolver um estudo de similaridade entre espécies do mesmo gênero, a fim de orientar o diagnóstico diferencial com os nematódeos ambientais. As larvas foram fixadas e diversos parâmetros corporais foram mensurados, para os quais foi realizada estatística descritiva e estudo de similaridade. Os resultados médios das larvas padrões foram compatíveis com os descritos para as espécies, com variabilidade em alguns parâmetros. *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* demonstraram similaridade de 59% para L1 e 79% para L3, com maior diferenciação entre os grupos em relação à extremidade anterior e ao primórdio genital. No *pool* de larvas de ancilostomídeos, verificou-se uma grande variação nos parâmetros avaliados, especialmente quanto ao comprimento total do corpo. *A. cantonensis* e *A. costaricensis* apresentaram 48% de similaridade entre L1 e 76% para L3. Por meio da análise morfométrica e de similaridade verificou-se a possibilidade do aprimoramento do diagnóstico diferencial de nematódeos de origem ambiental.

Palavras-chave. Larva Nematódeos, Helmintos, Achados Morfológicos e Microscópicos.

ABSTRACT

Due to the enormous diversity of nematodes in the environment, identifying nematodes of medical and veterinary significance within soil or food samples can be challenging. To facilitate the differential diagnosis with environmental nematodes, this study aimed morphologically and morphometrically characterize various larval stages of hookworms, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides venezuelensis*, *Angiostrongylus cantonensi* and *Angiostrongylus costaricensis*. Additionally, a similarity study was conducted among species within the same genus. The larvae were fixated and several body parameters were measured for the analysis, which included a comparison using descriptive statistics. Despite some parameter fluctuation, the average results for standard larvae were consistent with those of the respective species as a whole. The similarity between *S. stercoralis* and *S. venezuelensis* was 59% for L1 and 79% for L3, with more pronounced differences observed in the anterior extremity and the genital primordium. The examined parameters exhibited significant variation among the pool of hookworm larvae, particularly concerning the total length of the body. The similarities between *A. cantonensis* and *A. costaricensis* larvae ranged from 48% for L1 to 76% for L3. Analyses of morphometric and similarity data provided support for the potential improvement of differentiation between nematodes with environmental origins. This research contributes to enhancing the accuracy of identifying medically and veterinary relevant nematodes present in soil.

Keywords. Larvae, Nematodes, Helminths, Morphological and Microscopic Findings.

INTRODUÇÃO

Os nematódeos (Filo Nematoda) constituem um grupo altamente diverso, abundante e especializado de vermes cilíndricos e não segmentados, que vivem em ambientes variados incluindo o solo, desde que haja umidade suficiente para sua sobrevivência^{1,2}. A diversidade deste grupo está presente não somente na sua morfologia, como também em relação aos ciclos de vida, formas de reprodução, além da complexa ecologia^{3,4}.

Há mais de 23.000 espécies descritas, sendo a maioria de vida livre, porém há espécies parasitas de plantas (fitoparasitas), que causam prejuízos econômicos e uma ameaça à segurança alimentar em diversos países, além das espécies parasitas de animais vertebrados e invertebrados (zooparasitas) que determinam um forte impacto à saúde pública^{2,3,5,6}.

Dentre os nematódeos de importância médica ou veterinária, algumas espécies estão associadas à contaminação de alimentos, solo e água por apresentarem alguma fase de seu ciclo de vida no solo, geralmente entre as mudanças de fases larvárias e transferência de hospedeiros^{7,8}. Embora, nesse grupo, haja outros mecanismos de transmissão ambiental, há relatos da contaminação de vegetais frescos por larvas de *Strongyloides* spp. e ancilostomídeos⁹⁻¹³, além de evidências da transmissão de *Angiostrongylus* spp. associadas ao consumo de saladas na Jamaica^{14,15}.

A precisa identificação e diferenciação entre os nematódeos de amostras ambientais, como solo ou alimentos, é uma ação complexa, devido à grande diversidade de espécimes presentes e, em diferentes estágios evolutivos. Portanto, o diagnóstico diferencial de larvas de nematódeos de interesse médico-veterinário constitui uma importante abordagem metodológica na prevenção e controle das doenças parasitárias⁶.

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização morfológica e morfométrica de espécies mantidas em modelos experimentais ou isoladas de amostras clínicas, entre elas *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides venezuelensis*, ancilostomídeos, *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*, utilizadas como padrões morfológicos, e desenvolver um estudo de similaridade fenotípica entre espécies do mesmo gênero, a fim de orientar o diagnóstico diferencial com nematódeos isolados de amostras ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

As larvas padrões de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* utilizadas para o estudo foram obtidas de ciclo experimental mantido no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz. As larvas padrões de *S. venezuelensis* foram cedidas pelo do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, obtidas também de ciclo experimental. As larvas de *S. stercoralis* originam-se da coleção de espécimes isolados e preservados pelo Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz. As larvas de ancilostomídeos foram obtidas a partir do cultivo, pelo método de Harada e Mori¹⁶, de ovos encontrados em fezes de cães infectados, cedidas pelo Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo.

Todos os estágios larvários foram fixados a quente (56 °C) em AFA (álcool, formol e ácido acético) ou álcool 70%, e conservados em álcool 70% até a montagem de lâminas para a realização do estudo

morfométrico. As lâminas contendo os nematódeos foram montadas em solução alcóolica a 70%, cobertas com lamínula e vedadas utilizando esmalte a fim de evitar a evaporação do conteúdo por cerca de 48 horas, tempo suficiente para conservação do material até a finalização do estudo.

As análises morfológica e morfométrica dos espécimes foram realizadas em microscópio óptico de campo claro modelo Zeiss®, em aumento de 100 a 400 X, utilizando o programa Axio Vision LE®, para captura das imagens e aferição das medidas. Foram considerados os aspectos morfológicos relacionados à extremidade cefálica (vestíbulo bucal), tipo de esôfago, presença ou ausência de poro excretor e de primórdio genital, extremidade caudal e cutícula. Quanto aos parâmetros morfométricos (**Figura 1**), foram considerados para todos os gêneros: comprimento total do corpo (CTC); comprimento do esôfago (CE); largura do corpo, medida na altura da junção esôfago intestino (LC); distância do poro excretor a extremidade anterior (DPE); distância do ânus a cauda (DAC); distância do primórdio genital a cauda (DPGC), com algumas variações de parâmetros conforme o estágio larval ou a espécie analisada. Especificamente para o gênero *Strongyloides* e para os ancilostomídeos, foram adicionados os parâmetros: comprimento do vestíbulo bucal (CVB), largura da extremidade anterior (LEA), comprimento do primórdio genital (CPG) e largura do primórdio genital (LPG).

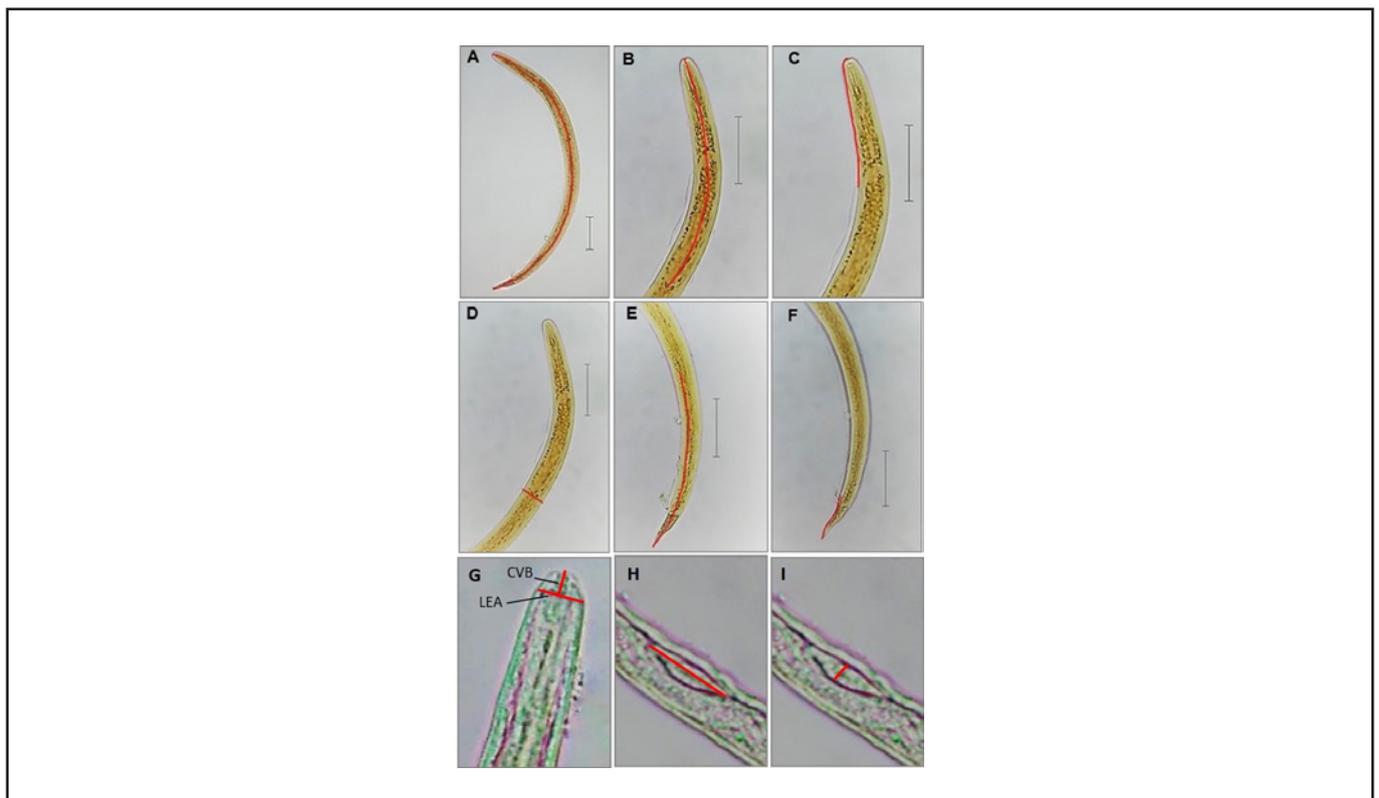


Figura 1. Medidas morfométricas demonstradas em larvas de terceiro estágio de *Angiostrongylus cantonensis* (A-F) e em larvas de primeiro estágio de *Strongyloides stercoralis* (G-I): (A) comprimento total do corpo (CTC); (B) comprimento do esôfago (CE); (C) distância do poro excretor a extremidade anterior (DPE); (D) largura do corpo (LC); (E) distância do primórdio genital a cauda (DPGC); (F) distância do ânus a cauda (DAC); (G) comprimento do vestíbulo bucal (CVB), largura da extremidade anterior (LEA); (H) comprimento do primórdio genital e (I) largura do primórdio genital. Escala = 50 μ m

As medidas, obtidas em micrometros, foram tabuladas em programa Microsoft Excel® para cálculo de médias, medianas, desvio padrão, coeficiente de variação, relação entre largura do corpo e comprimento total do corpo (LC/CTC), relação entre comprimento do esôfago e comprimento total do corpo (CE/CTC), relação entre o comprimento do vestíbulo bucal e a largura da extremidade anterior (CVB/LEA) e relação entre comprimento do primórdio genital e largura do primórdio genital (CPG/LPG).

O estudo de similaridade fenotípica realizado foi baseado nos trabalhos de Rocco¹⁷ e Mota¹⁸, e consistiu em uma análise multivariada entre grupos de larvas de espécies diferentes com características morfológicas comuns. As medidas registradas para cada parâmetro morfométrico foram comparadas entre as espécies, considerando o intervalo de valores máximos e mínimos dos mesmos parâmetros da espécie padrão, e transformados em uma matriz binária com atribuição de valores 0 ou 1. Desta forma, adotou-se como escore 1 a medida que se encontrou dentro do intervalo de valores máximos e mínimos, e escore 0 a medida que estava fora deste intervalo. A somatória destes valores, ou seja, o número de parâmetros coincidentes em relação ao padrão foi dividido pelo número total de parâmetros avaliados (n) e convertida em percentual de similaridade, segundo Yamada¹⁹, considerando uma escala de 0 a 100%.

Para o gênero *Strongyloides*, os dados morfométricos da espécie *S. stercoralis* foram comparados com os dados de *S. venezuelensis*, de forma separada para o estágio rabditoide e o estágio filarioide. No gênero *Angiostrongylus*, os dados da espécie *A. cantonensis* foram comparados com os dados de *A. costaricensis*, para cada estágio larvar (L1 e L3). Não foi realizado estudo de similaridade entre os ancilostomídeos por não serem originados de cepas padrões.

RESULTADOS

Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis*

As larvas rabditoides e filarioides de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* examinadas apresentaram características morfológicas semelhantes como demonstrado na **Figura 2**. Especificamente para *S. venezuelensis*, as larvas rabditoides de primeiro (L1) e segundo (L2) estágios se mostraram morfológicamente análogas, porém as L2 apresentaram um alongamento de todo o corpo. As larvas rabditoides (L1) de *S. stercoralis* apresentaram valores aproximados de média e mediana, com desvio padrão inferior a 10% para todos os parâmetros avaliados, indicando pouca variabilidade morfométrica entre os exemplares analisados para esse estudo. Foi observada pouca variação entre os valores médios nos parâmetros morfométricos das larvas rabditoides L1 e L2 de *S. venezuelensis*, com exceção da DPGC, cujo desvio padrão foi discretamente superior a 10%, em ambos os grupos. Como esperado, as larvas rabditoides L2 apresentaram-se maiores em todas as dimensões, em relação às larvas rabditoides L1, e as relações LC/CTC e CE/CTC foram inferiores, devido ao aumento expressivo do comprimento médio das larvas L2. Os dados morfométricos das larvas rabditoides e filarioides do gênero *Strongyloides* estão apresentados na **Tabela 1**.

A comparação morfométrica entre *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* demonstrou similaridade de 59% para larvas rabditoides (L1) e de 79% para larvas filarioides (L3). Os parâmetros relacionados à extremidade anterior (CVB e LEA) e ao primórdio genital (CPG e LPG) foram os que apresentaram maior diferenciação entre os grupos.

Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de ancilostomídeos

As características morfológicas das larvas rabditoídes e filarióides de ancilostomídeos estão apresentadas na **Figura 2**, comparativamente com as larvas de *Strongyloides*. Em virtude de ter sido analisado um *pool* de larvas de ancilostomídeos, de diferentes origens, verificou-se uma grande variação entre valores máximos e mínimos na maioria dos parâmetros avaliados, especialmente em relação ao CTC, indicando pouca uniformidade entre os espécimes. Porém, com exceção do CTC, os valores medianos de ambos se mantiveram aproximados e o desvio padrão se apresentou em torno de 10% para a maioria dos parâmetros. Para as larvas filarióides foram incluídos os valores de comprimento e largura da muda. Os dados morfométricos das larvas de ancilostomídeos estão apresentados na **Tabela 1**.

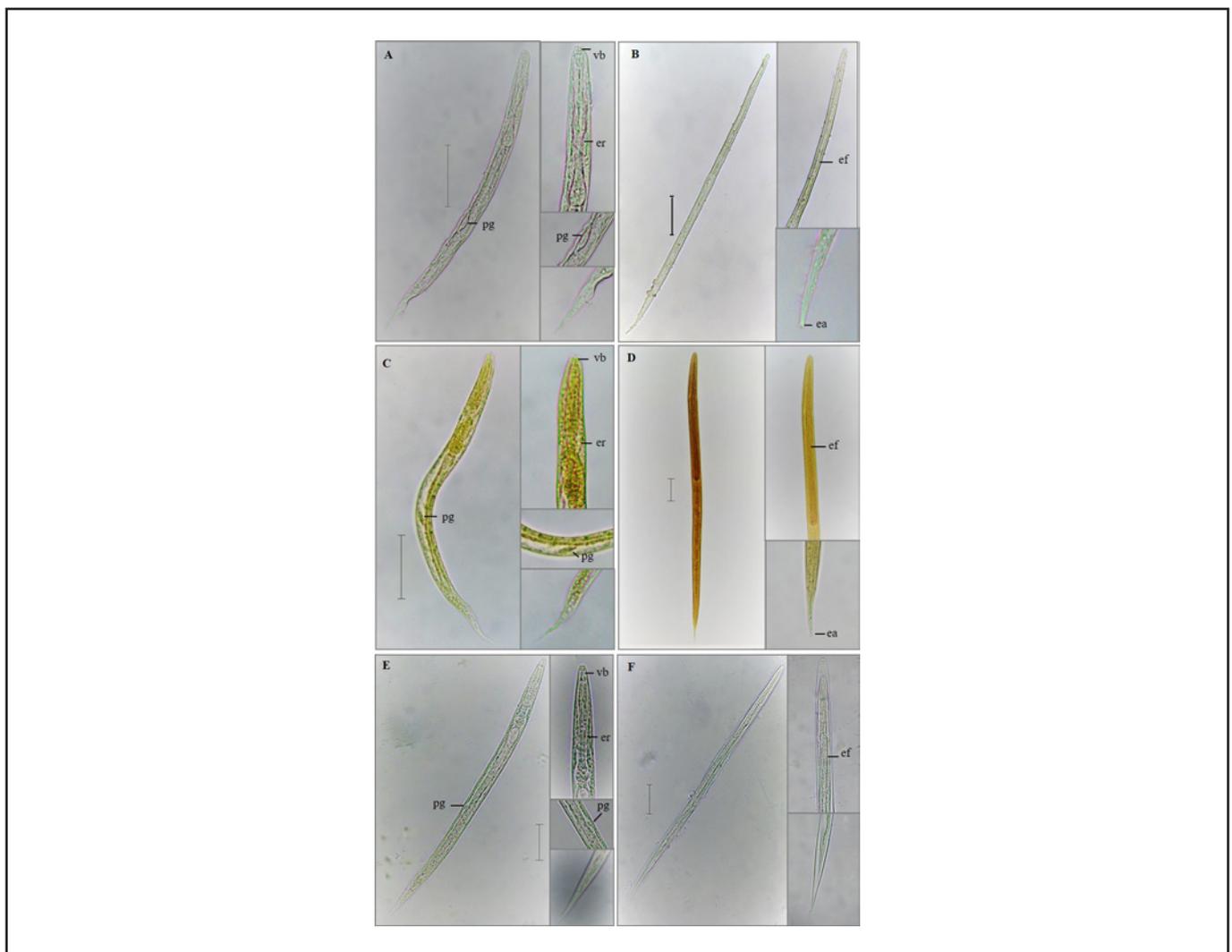


Figura 2. Larvas rabditoídes e filarióides de *S. stercoralis* (A) e (B), *S. venezuelensis* (C) e (D) e ancilostomídeo (E) e (F), demonstrando detalhes da extremidade anterior com vestíbulo bucal (vb), esôfago do tipo rabditoíde (er), composto de corpo (c), istmo (i) e bulbo (b), esôfago do tipo filarióide (ef); primórdio genital (pg) e extremidade posterior, indicando o entalhe apical (ea). Escala = 50 μ m

Tabela 1. Dados morfológicos e morfométricos (μm) de larvas rabditoides e filarioides de *S.stercoralis*, *S. venezuelensis* e ancilostomídeos

	<i>Strongyloides stercoralis</i>		<i>Strongyloides venezuelensis</i>			Ancilostomídeos	
	L1	L3	L1	L2	L3	L1	L3
Extremidade anterior	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada
Vestíbulo bucal	curto	ausente	curto	curto	ausente	longo	ausente
Tipo de esôfago	rhabditiforme	filariforme	rhabditiforme	rhabditiforme	filariforme	rhabditiforme	filariforme
Cutícula	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	finas estrias	finas estrias
Extremidade posterior	reta, afilada	reta, afilada	reta, afilada	reta, afilada	reta, afilada	longa, afilada	afilada, com bainha
Terminação da cauda	pontiaguda	com entalhe apical	pontiaguda	pontiaguda	com entalhe apical	pontiaguda	pontiaguda
Primórdio genital	alongado, oval, visível	pouco evidente	alongado, oval, visível	alongado, oval, pouco evidente	não evidente	pequeno, oval, pouco evidente	pouco evidente
CTC	236,77 – 299,92	425,68 – 483,73	201,22 – 265,67	442,49 – 576,91	433,21 – 547,78	328,00 – 695,78	480,76 – 685,59
CE	70,91 – 86,07	123,83 – 211,09	68,08 – 86,14	90,01 – 120,48	160,87 – 196,69	80,24 – 147,43	103,69 – 167,85
LC	13,61 – 17,01	11,01 – 14,24	10,99 – 15,88	16,78 – 23,77	12,95 – 19,26	16,03 – 29,89	11,02 – 28,64
DAC	37,65 – 47,84	44,07 – 64,05	29,20 – 37,84	55,10 – 77,35	40,89 – 66,67	65,95 – 105,47	55,83 – 92,78
DPGC	88,96 – 123,17	148,35 – 204,84	87,46 – 117,98	172,04 – 264,54	–	253,05 – 283,02	224,29 – 267,99
CVB	2,73 – 4,98	–	2,95 – 6,07	3,41 – 6,30	–	10,18 – 18,06	–
LEA	7,36 – 9,57	6,02 9,12	5,87 – 8,04	6,20 – 8,66	5,25 – 7,08	9,02 – 15,87	6,50 – 17,18
CPG	11,84 – 20,73	–	2,12 – 3,49	11,85 – 24,29	–	8,82 – 11,03	–
LPG	3,55 – 6,07	–	2,55 – 5,19	2,12 – 8,12	–	2,68 – 3,62	–

CTC – comprimento total do corpo; CE – comprimento do esôfago; LC – largura do corpo; DAC – distância do ânus a cauda; DPGC – distância do primórdio genital a cauda; CVB – comprimento do vestibulo bucal; LEA – largura da extremidade anterior; CPG – comprimento do primórdio genital e LPG – largura do primórdio genital

Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*

Larvas de primeiro e terceiro estágio de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* estão demonstradas na **Figura 3** e seus dados morfológicos e morfométricos estão apresentados na **Tabela 2**. Ambas apresentaram pouca variabilidade quanto aos parâmetros avaliados, com pequeno desvio padrão e valores médios extremamente aproximados, ou até mesmo sem diferença em parâmetros como LC/CTC e CE/CTC. L1 de *A. costaricensis* apresentaram valores de CTC, CE e LC menores do que as L1 de *A. cantonensis*, porém as relações LC/CTC e CE/CTC foram numericamente iguais. Larvas de terceiro estágio de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* apresentaram pouca ou nenhuma variabilidade nos parâmetros morfométricos analisados, principalmente para DPGC, DAC, LC/CTC e CE/CTC, nos dois grupos individualmente. L3 de *A. costaricensis* ainda apresentaram valores médios iguais para CE e LC, demonstrando tratar-se de um padrão bem homogêneo. A comparação morfométrica entre *A. cantonensis* e *A. costaricensis* indicou 48% de similaridade entre as larvas L1, com menor similaridade para os parâmetros de CTC e CE e 76% de similaridade para as larvas L3, com menor similaridade para DAC e ausência de similaridade para CE.

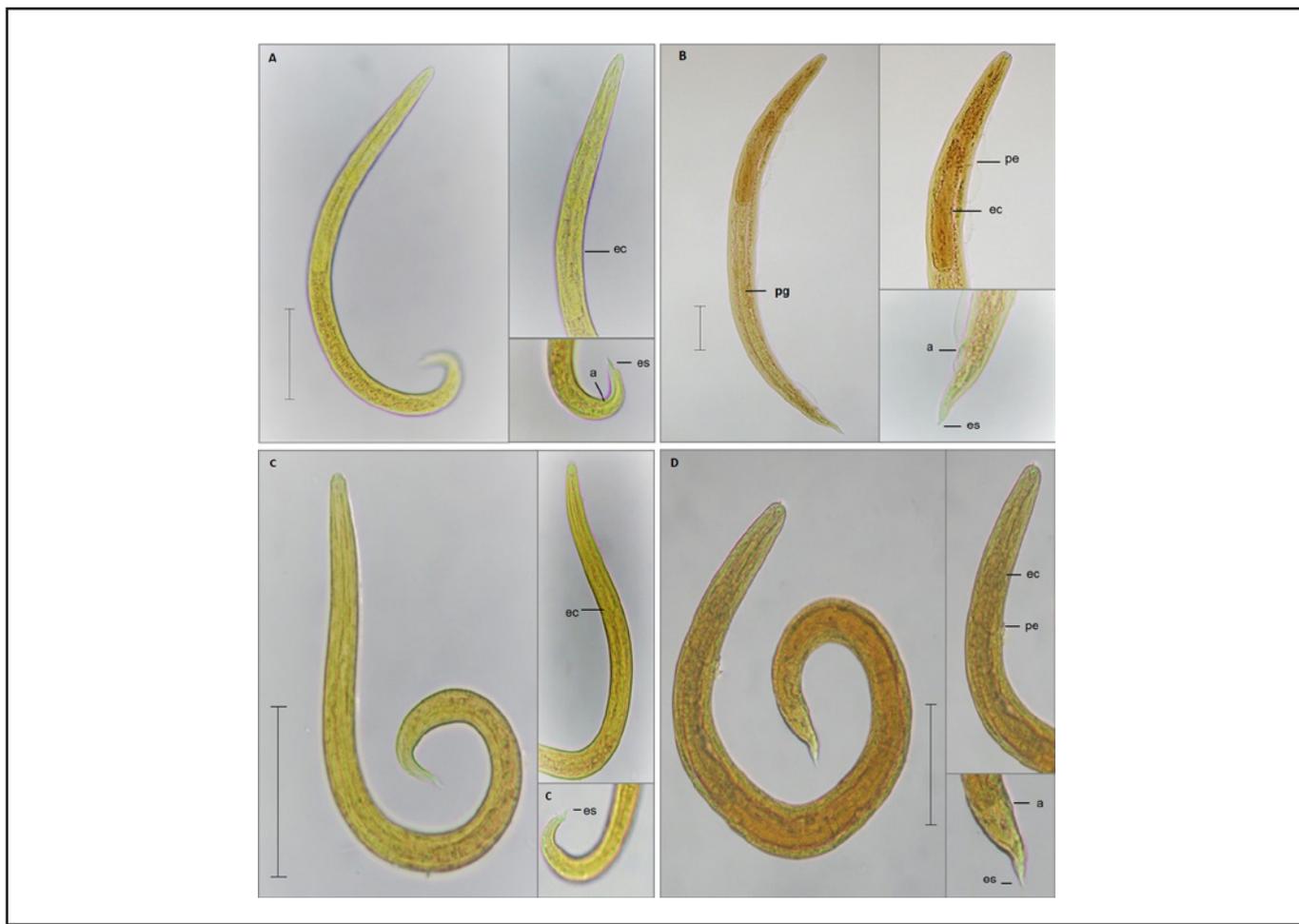


Figura 3. Larvas de primeiro e de terceiro estágio de *A. cantonensis* (A) e (B) e *A. costaricensis* (C) e (D), demonstrando o esôfago do tipo claviforme (ec), poro excretor (pe), primórdio genital (pg) e extremidade posterior, indicando o ânus (a) e a espícula (es). Escala = 50 µm

Tabela 2. Dados morfológicos e morfométricos (μm) de larvas de primeiro (L1) e terceiro estágio (L3) de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*

	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>		<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	
	L1	L3	L1	L3
Extremidade anterior	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada
Vestíbulo bucal	ausente	ausente	ausente	ausente
Tipo de esôfago	reto, longo, claviforme	reto, longo, claviforme	reto, longo, claviforme	reto, longo, claviforme
Extremidade posterior (cauda)	curta, curva	curta, curva	curta, curva	curta, curva
Terminação da cauda	ponta fina com espícula	ponta fina com espícula	ponta fina com espícula	ponta fina com espícula
Primórdio genital	não evidente	oval, evidente	não evidente	oval evidente
Cutícula	finas estrias transversais	finas estrias transversais	finas estrias transversais	finas estrias transversais
CTC	206,73 – 291,35	434,04 – 482,66	201,99 – 243,96	413,69 – 489,92
CE	101,33 – 136,12	162,17 – 182,68	97,8 – 114,40	143,8 – 160,24
LC	10,67 – 13,81	22,76 – 32,99	9,38 – 12,91	22,45 – 28,53
DPE	–	81,11 – 97,78	–	75,7 – 95,31
DAC	14,86 – 25,19	31,36 – 46,92	17,69 – 25,12	19,89 – 36,92
DPGC	–	136,02 – 174,52	–	132,66 – 166,39

CTC – comprimento total do corpo; CE – comprimento do esôfago; LC – largura do corpo; DPE – distância do poro excretor; DAC – distância do ânus a cauda; e DPGC – distância do primórdio genital a cauda

DISCUSSÃO

Os nematódeos são reconhecidos entre os helmintos por apresentarem ciclos biológicos complexos e grande diversidade de formas evolutivas. A literatura é vasta no que se refere à morfologia de vermes adultos, tanto de vida livre como fitonematóides ou espécies de interesse médico. Contudo a identificação dos seus estágios larvares, infectantes ou intermediários, ainda é um grande desafio, principalmente no caso de amostras ambientais^{2,20,21}. Portanto, a adoção de critérios precisos de identificação em relação aos caracteres morfológicos e morfométricos das larvas de nematódeos é determinante para o diagnóstico diferencial dos espécimes. Diversos autores recorreram à combinação de dados morfométricos como ferramenta para a diferenciação de larvas de diferentes gêneros de nematódeos isoladas de hospedeiros vertebrados e invertebrados^{20,22-25}.

No presente estudo, as larvas filarioides de *S. stercoralis* apresentaram medidas morfométricas inferiores as apresentadas por Little²⁰, no entanto se mantiveram dentro do intervalo de variação descrito para o gênero *Strongyloides*. Da mesma forma, larvas de *S. stercoralis* isoladas de pacientes com strongiloidíase, tanto por Teixeira²⁶ quanto por Miné²¹, apresentaram valores médios superiores às larvas padrões desse estudo. Já as larvas padrão de *S. venezuelensis* se apresentaram dentro do intervalo de variação apresentado por Little²⁰ para a espécie, em relação aos parâmetros CTC e DAC, e inferiores quanto ao CE e LC. Em comparação aos dados obtidos por Tobar et al²⁷, as larvas rabditoides L1 e filarioides L3 do padrão apresentaram valores médios de CTC e LC inferiores, enquanto as larvas L2 apresentaram esses valores médios superiores. Entre as hipóteses possíveis para as diferenças nos dados morfométricos dos estudos, destaca-se a dificuldade de padronização exata dos estágios larvares, uma vez que as larvas permanecem em processo de desenvolvimento e crescimento contínuo.

Little²⁰ e Vieira et al²⁸ ressaltaram a dificuldade de diferenciação de espécies por características morfológicas dentro do gênero *Strongyloides*. No entanto, os dados da avaliação de similaridade por escores do presente estudo sugerem que há uma possibilidade de diferenciação entre larvas de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* pelas características da largura da extremidade anterior (LEA), e pelas medidas de comprimento e largura do primórdio genital (CPG e LPG), principalmente para larvas rabditoides L1, que não foram adotadas por esses autores. No caso das larvas filarioides, o parâmetro LEA se mostrou promissor, embora sejam necessárias maiores investigações para uma conclusão efetiva.

Com relação aos ancilostomídeos, o padrão morfométrico foi desenvolvido a partir de um *pool* de larvas obtidas de material fecal canino. A semelhança nas médias dos parâmetros CTC, LC e DAC das larvas filarioides do padrão com as larvas infectantes de *A. caninum* descritas por Nichols²⁹ permitem sugerir que essa seja a espécie mais provável das larvas padrão. Porém, por se tratar de *pool* de larvas, pode haver outras espécies envolvidas, como *A. brasilienses* ou *A. ceylanicum*³⁰. No entanto, ao se comparar os resultados médios das larvas filarioides do presente estudo com os dados apresentados por Yoshida³¹, para larvas infectantes de *A. brasilienses*, *A. ceylanicum* e *A. duodenale*, originadas de cães experimentalmente infectados, as larvas padrões apresentaram medidas morfométricas inferiores para CTC, CTM e CE e semelhante aos de LC, em relação a todas as espécies. Devido à ausência de larvas de ancilostomídeos de origem humana no período do estudo, não foi realizada avaliação de similaridade fenotípica para esse

gênero, porém as larvas filarioides do padrão apresentaram valores médios também inferiores às larvas filarioides de *A. duodenale* e *Necator americanus*, extraídas de fezes humanas, para os parâmetros de CTC e LC, descritos por Corrêa et al³².

No gênero *Angiostrongylus*, os dados morfométricos obtidos de larvas L3 de *A. cantonensis* estão em concordância com os isolados de referência de Ash²⁴ e Mota et al²⁵, para todos os parâmetros avaliados. Os valores médios foram concordantes com o intervalo de variação das larvas infectantes identificadas por Mota et al²⁵, obtidas de infecção natural de moluscos. Igualmente, os dados dos padrões de larvas L3 de *A. costaricensis* foram compatíveis com os das cepas de referência apresentados por Rocco¹⁷ e por Mota¹⁸.

A análise de similaridade por escore é um sistema binomial que tem sido utilizado para comparações de características distintas, por exemplo, na avaliação da diversidade genética pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)³³, aplicada para diferentes organismos como cepas de bactérias³⁴, protozoários³⁵, plantas³⁶ e artrópodes³⁷. Esta análise também tem sido utilizada na avaliação da diversidade morfológica entre os mesmos estágios evolutivos de parasitos, como as larvas de metastrongilídeos, para comparar populações de larvas infectantes (L3) isoladas de moluscos terrestres, com angiostrongilídeos de importância médica (*A. cantonensis* e *A. costaricensis*), estabelecidos em modelos experimentais^{17,18}.

Nesse estudo, essa técnica foi aplicada para comparação de múltiplos parâmetros morfométricos, o que demonstrou ser eficiente na diferenciação entre espécies do mesmo gênero. O percentual de similaridade encontrado entre *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, de 48% para larvas L1 e de 76% para larvas L3, demonstrou diferenças morfométricas importantes entre elas, principalmente quanto ao comprimento do esôfago (CE) das L3, que se destacou por não apresentar nenhuma similaridade entre as duas espécies comparadas. Mota¹⁸ detectou similaridade entre 85% a 99% com isolados de referência L3 de *A. cantonensis* e baixa similaridade para outras espécies do gênero, como *A. costaricensis*. Houve concordância de 100% entre o diagnóstico morfológico e molecular de *A. cantonensis*, nos casos com similaridade superior a 85%, confirmando a aplicabilidade diagnóstica da análise de similaridade por escore para esse gênero. A correspondência do diagnóstico molecular com a avaliação da similaridade validado por Souza et al³⁸, reforça a perspectiva de utilização deste método como um recurso para a identificação e diagnóstico diferencial de larvas de origem ambiental, contribuindo para uma identificação mais precisa.

CONCLUSÃO

Os resultados médios das larvas padrões foram compatíveis com os descritos para as espécies, com variabilidade em alguns parâmetros morfométricos.

Estudos morfológicos e morfométricos de nematódeos de interesse médico-veterinário, em diferentes estágios larvares, podem contribuir para o diagnóstico diferencial de nematódeos de origem ambiental, incluindo amostras de alimentos, pois permitem uma comparação mais detalhada entre os espécimes.

Verificou-se que há uma perspectiva de aplicação da análise de similaridade para realizar a diferenciação específica entre larvas de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, e entre larvas de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* quando adicionados parâmetros morfométricos relacionados ao vestíbulo bucal e ao

primórdio genital. A utilização de dados de múltiplos parâmetros e analisados em conjunto foi eficiente, conferindo maior segurança para a diferenciação dessas espécies.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTOS

A William Henry Roldán Gonzáles, doutorando do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, por disponibilizar larvas de *Strongyloides venezuelensis* para este estudo.

Ao Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo, pela disponibilização de material para obtenção de larvas ancilostomídeos.

A Augusta Mendes da Silva, Márcia Dimov Nogueira e Maria Aparecida Moraes Marciano, pesquisadoras do Núcleo de Morfologia e Microscopia do Instituto Adolfo Lutz, e a Antonio Roberto de Souza Ferreira, técnico de apoio à pesquisa da mesma instituição, pelas contribuições e apoio técnico para a realização deste estudo.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Laís Fernanda de Pauli-Yamada participou da concepção e planejamento do estudo, análise e interpretação dos dados e redação do manuscrito. Pedro Luiz Silva Pinto atuou na concepção e planejamento do estudo, análise e interpretação dos dados, revisão crítica do conteúdo e aprovação da versão final do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Os resultados deste artigo integram a dissertação de mestrado de Laís Fernanda de Pauli-Yamada, intitulada “Detecção de nematódeos em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em São Paulo: diagnóstico diferencial com padrão de larvas de risco à saúde”, defendida no ano de 2021, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

REFERÊNCIAS

1. De Ley P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny [Internet]. WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology. WormBook; 2006. [acesso 2020 Fev 09]. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19684/>
2. Ferraz LCCB, Brown DJF, editores. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: Norma Editora; 2016. p. 251. [acesso 2020 Jul 27]. Disponível em:
<https://www.nematologia.com.br/files/livros/1.pdf>

3. Blaxter M. Nematodes: the worm and its relatives. PLoS Biology. 2011;9(4):e1001050.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001050>
4. Ferraz LCCB. Nematoides. In: Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres; 2018. p. 1-18. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/324391159>
5. Seesao Y, Gay M, Merlin S, Viscogliosi E, Aliouat-Denis CM, Audebert C. A review of methods for nematode identification. J Microbiol Methods. 2017;138:37-49.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.030>
6. Bogale M, Baniya A, DiGennaro P. Nematode identification techniques and recent advances. Plants. 2020;9(10):1260.
<https://doi.org/10.3390/plants9101260>
7. Amoah ID, Singh G, Stenström TA, Reddy P. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: a review of current state-of-the-art and future perspectives. Acta Trop. 2017;169:187-201.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.014>
8. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. Lancet. 2006;367(9521):1521-32.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)
9. Adenusi AA, Abimbola WA, Adewoga TO. Human intestinal helminth contamination in pre-washed, fresh vegetables for sale in major markets in Ogun State, southwest Nigeria. Food Control. 2015;50:843-9.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.033>
10. Luz JGG, Barbosa MV, Carvalho AG, Resende SD, Dias JVL, Martins HR. Contamination by intestinal parasites in vegetables marketed in an area of Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Rev Nutr. 2017;30(1):127-36.
<https://doi.org/10.1590/1678-98652017000100012>
11. Silva LGB, Silva LMB, Arrais FMA, Melanda GCS, Ferreira RJ. Prevalência de estruturas parasitárias de protozoários e de helmintos em hortaliças comercializadas em barracas de rua no município de Crato-CE, Brasil. Revista Saúde (Santa Maria). 2018;44(3).
<https://doi.org/10.5902/2236583429982>

12. Rodrigues AC, Silva MDC, Pereira RAS, Pinto LC. Prevalence of contamination by intestinal parasites in vegetables (*Lactuca sativa* L. and *Coriandrum sativum* L.) sold in markets in Belém, northern Brazil. J Sci Food Agric. 2020;100:2859-65.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.10265>
13. Amer OH, Ras R, El-Alfy SA, Raef A. Prevalence and morphological characters of *Strongyloides stercoralis* contaminating some fresh raw vegetables in Sharkia province, Egypt. EVMSPJ. 2020;16:158-71.
<https://doi.org/10.21608/evmspj.2020.132894>
14. Waugh CA, Lindo JF, Lorenzo-Morales J, Robinson RD. An epidemiological study of *A. cantonensis* in Jamaica subsequent to an outbreak of human cases of eosinophilic meningitis in 2000. Parasitology. 2016;143(9):1211-17.
<https://doi.org/10.1017/S0031182016000640>
15. Kramer KJ, Posner J, Gosnell WL. Role of gastropod mucus in the transmission of *Angiostrongylus cantonensis*, a potentially serious neurological infection. ACS Chem Neurosci. 2018;9(4):629-32.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00491>
16. Harada YAOM, Mori O. A New Method for culturing Hook Worm. Yonago Acta Med. 1955;1(3):177-9.
17. Rocco SC. Infecção natural de nematódeos parasitas em *Achatina fulica* Ferussac (Gigante Africano) (gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) relacionada com as condições sanitárias em vida livre e em criações comerciais no Estado de São Paulo. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007. Disponível em:
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/sus-19498>
18. Mota DJG. Infecção natural por larvas de metastrongilídeos em moluscos terrestres de diferentes regiões do estado de São Paulo [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2018. Disponível em:
https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/08/1008307/dan-tese-final_.pdf
19. Yamada LFP. Detecção de nematódeos em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em São Paulo: diagnóstico diferencial com padrão de larvas de risco à saúde [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2021. Disponível em:
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1358837>
20. Little MD. Comparative morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. J Parasitol. 1966;52(1):69-84.
<https://doi.org/10.2307/3276396>

21. Miné JC. Caracterização de cepas de *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) Stiles & Hassal, 1902 (Rhabditida, Strongyloididae) isoladas de pacientes com e sem sintomatologia da região de Araraquara-SP. [tese de doutorado]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista; 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/104538>
22. Joachim A, Dülmer N, Dauschies A. Differentiation of two *Oesophagostomum* spp. from pigs, *O. dentatum* and *O. quadrispinulatum*, by computer-assisted image analysis of fourth-stage larvae. Parasitol Int. 1999;48(1):63-71. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(99)00003-3)
23. van Wyk JA, Cabaret J, Michael LM. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. Vet Parasitol. 2004; 119(4):277-306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>
24. Ash LR. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). J Parasitol. 1970; 56(2):249-53. <https://doi.org/10.2307/3277651>
25. Mota DJG, Melo LCV, Pereira-Chioccola VL, Gava R, Pinto PLS. First record of natural infection by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) in *Belocaulus willibaldoi* and *Rattus norvegicus* in an urban area of São Paulo city, SP, Brazil. Heliyon. 2020;6(10):e05150. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05150>
26. Teixeira ATLS. *Strongyloides stercoralis*: frequência em exames parasitológicos do Hospital de Clínicas da UNICAMP e análise morfométrica das larvas. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30(1):75-6. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000100016>
27. Tobar J, Sarmiento DR, Tayupanta D, Rodríguez M, Aguilar F. Microscopic and molecular evaluation of *Strongyloides venezuelensis* in an experimental life cycle using Wistar rats. Biomédica. 2021;41(Supl. 1):35-46. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5650>
28. Vieira FM, Lima SS, Bessa ECA. Morfologia e biometria de ovos e larvas de *Strongyloides* sp. Grassi, 1879 (Rhabditoidea: Strongyloididae), parasito gastrointestinal de *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) (Rodentia: Hydrochaeridae), no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais. Rev Bras Parasitol Vet. 2006;15(1):7-12. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/3978/397841457002.pdf>

29. Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans: II. Comparative larval morphology of *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* and *Ancylostoma caninum*. J Parasitol. 1956;42(4):363-99.
<https://doi.org/10.2307/3274519>
30. Burrows RB. Comparative morphology of *Ancylostoma tubaeforme* (Zeder, 1800) and *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859). J Parasitol. 1962;48(5):715-18.
<https://doi.org/10.2307/3275261>
31. Yoshida Y. Comparative Studies on *Ancylostoma braziliense* and *Ancylostoma ceylanicum*. II. The infective larval stage. J Parasitol. 1971;57(5):990-2.
<https://doi.org/10.2307/3277852>
32. Corrêa LL, Silva MIPG, Silva RM, Dias RMDS. *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*: diagnóstico diferencial das larvas infestantes e prevalência em amostras fecais provenientes da grande São Paulo. Rev Inst Adolfo Lutz. 1979;39(2):145-53. Disponível em:
<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/37309>
33. Babu KN, Rajesh MK, Samsudeen K, Minoos D, Suraby EJ, Anupama K et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques. Methods Mol Biol. 2014;1115:191-209.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_10
34. Gzyl A, Augustynowicz E. Technical aspects of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in genotyping of bacterial strains. Acta Microbiol Pol. 1999;48(3):243-59. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10756711>
35. Howard J, Carlton JMR, Walliker D, Jensen JB. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in inheritance studies of *Plasmodium falciparum*. J Parasitol. 1996;82(6):941-6.
<https://doi.org/10.2307/3284203>
36. Ezzat SM, El Sayed AM, Salama MM. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity of eight aloe species. Planta Med. 2016;82(15):1381-6.
<https://doi.org/10.1055/s-0042-108208>
37. Fraga J, Rodriguez J, Fuentes O, Fernandez-Calienes A, Castex M. Optimization of random amplified polymorphic DNA techniques for use in genetic studies of cuban triatominae. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2005;47(5):295-300.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000500010>

38. Souza F, Santos MA, Alves DA, Melo LCVM, Mota DJG, Pertile AC et al. *Angiostrongylus cantonensis* in urban populations of terrestrial gastropods and rats in an impoverished region of Brazil. Parasitology. 2021;148(8):994-1002.

<https://doi.org/10.1017/S0031182021000597>

