



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL**

ALINE DA SILVEIRA BATISTA

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA RECUPERAÇÃO DE OVOS DE
Toxocara spp. EM AMOSTRAS DE SOLO**

Presidente Prudente - SP
2018

ALINE DA SILVEIRA BATISTA

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA RECUPERAÇÃO DE OVOS DE
Toxocara spp. EM AMOSTRAS DE SOLO**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:
Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém.

636.089 695 9
B333c

Batista, Aline da Silveira.

Comparação de métodos para recuperação de ovos de *Toxocara* spp. em amostras de solo / Aline da Silveira Batista. – Presidente Prudente, 2018.
29f.:il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.

Orientador: Vamilton Alvares Santarém.

1. Toxocaríase.
2. Diagnóstico.
3. Contaminação ambiental. I. Título.

ALINE DA SILVEIRA BATISTA

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA RECUPERAÇÃO DE OVOS DE
Toxocara spp. EM AMOSTRAS DE SOLO**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 16 de agosto de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Rogério Giuffrida
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Rodrigo Costa da Silva
Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP-CLM
Bandeirantes - Paraná

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial na minha vida, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada. Aos meus pais, Luiz e Jenice, que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. As minhas irmãs, Andréia e Adriana, pelo carinho, paciência e pela compreensão nos momentos de angústias. Obrigado por estarem sempre do meu lado. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado saúde, força e toda disposição para enfrentar todas as dificuldades e conseguir concluir mais uma etapa da minha vida.

O meu sucesso também não seria possível sem o apoio e o incentivo dos meus pais e irmãs, que infinitas vezes me motivaram a seguir a diante. Obrigado pelo carinho, amor, confiança, serei eternamente grata.

Ao meu querido orientador, por todo o ensinamento, paciência e amizade, sou eternamente grata por toda ajuda e, não estaria aonde estou se o senhor não tivesse acreditado no meu potencial.

A Marli Bonine, minha querida psicóloga, que esteve presente em todos os momentos, principalmente naqueles de dificuldades e angustias, sendo meu alicerce e força nas vezes em que pensei em desistir.

A todos os meus amigos, que durante este processo trouxeram um pouco de distração, imprescindível para renovar minha energia para continuar o meu trabalho. As técnicas de laboratório Sidenir Aparecida Bráz, Mayara de Oliveira Vidotto, obrigada pela compreensão e dedicação para que eu pudesse realizar meu projeto.

À UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista, pela oportunidade de realizar este projeto e por toda a estrutura oferecida.

E a todos que de alguma forma contribuíram e acreditaram nesse projeto, obrigada.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis

(José de Alencar)

RESUMO

Comparação de métodos para recuperação de ovos de *Toxocara* spp. em amostras de solo

O objetivo do estudo foi comparar a eficiência de três técnicas de recuperação de ovos de *Toxocara* spp., a partir de amostras de solo artificialmente e naturalmente contaminadas. Na primeira etapa, amostras de solo (n= 12 amostras de 1g) foram contaminadas com 100 ovos de *T. canis*. Foram utilizadas três técnicas: 1) centrifugo-sedimentação após filtragem do solo em série de quatro tamises (300, 212, 90 e 63 μm); 2) centrifugo-flutuação com sulfato de zinco ($d = 1.35 \text{ g/cm}^3$) após tamisação; e, 3) centrifugo-flutuação com sulfato de zinco sem tamisação. A recuperação de ovos pela técnica 1 foi significativamente superior às demais, com 78,25%; 16,33% e 10,92% de positividade, respectivamente. Em uma segunda etapa, foram avaliadas amostras de solo de 15 praças e parques públicos de Presidente Prudente, São Paulo, durante um período de 6 meses, com comparação das técnicas 1 e 2. A recuperação de ovos pela técnica 1 mostrou ser mais eficiente. Em três meses avaliados, houve diferença significativa na média dos ovos recuperados. A técnica de tamisação centrifugo-sedimentação mostrou maior eficiência na recuperação de ovos de *Toxocara* spp. em relação as outras técnicas. A técnica é de baixo custo, fácil execução e não requer soluções com riscos ambientais para sua execução.

Palavras-chave: Contaminação ambiental, Diagnóstico, Larva Migrans, Toxocaríase, Zoonose.

ABSTRACT

Comparison of different techniques to recover *Toxocara* spp. Eggs from soil samples

The objective of this study was to compare the efficiency of different techniques to recover *Toxocara* spp. eggs from artificially and naturally contaminated soil samples. In the first stage, soil samples (n= 12 samples of 1g) were artificially contaminated with 100 eggs of *T. canis*. Three techniques were used: 1) centrifugal-sedimentation after soil filtration in a series of four sieves, using distilled water (300, 212, 90, and 63 μm); 2) centrifugal-flotation with zinc sulfate ($d= 1.35 \text{ g/cm}^3$) after sieving; and, 3) centrifugal-flotation with zinc sulfate without sieving. The recovery of eggs using technique 1 was significantly superior to the other techniques, with 78.25%, 16.33%, and 10.92% positivity, respectively. In the second stage, soil samples from 15 public squares/parks were evaluated over a period of 6 months, comparing the more efficient techniques in stage 1 (techniques 1 and 2). The recovery of eggs by technique 1 was more efficient. In the three out of the 6 months evaluated, there was a significant difference in the mean number of eggs recovered, using the technique of centrifugal-sedimentation with sieving. The technique is low cost, easy to implement, and does not require solutions which present environmental risks for its execution.

Key-words: Diagnosis, environmental contamination, Larva Migrans, Toxocariasis, Zoonosis.

LISTA DE SIGLAS

- g – Força centrífuga
- g/cm^3 – Gramas por centímetros cúbicos
- $^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius
- μL – Microlitro
- μm – Micrômetro
- mL – Mililitro
- p – Nível de significância
- n – Número de amostras
- % – Por cento
- rpm – Rotações por minuto

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO	12
-------------------------	----

1 **ARTIGO CIENTÍFICO**

2

3 **Comparação de métodos para recuperação de ovos de *Toxocara* spp.**
4 **em amostras de solo**5 Aline da Silveira Batista¹, Yslla Fernanda Fitz Balo Merigueti¹, Priscila Carolina Gonçalves²,
6 Sidenir Aparecida Bráz², Rogério Giuffrida³, Vamilton Alvares Santarém^{3*}.

7

8 (1) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista
9 (Unoeste), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

10 (2) Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva II- Hospital Veterinário, Unoeste.

11 (3) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Laboratório de Medicina Veterinária
12 Preventiva II- Hospital Veterinário, Unoeste.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

* Normas para Publicação. Veterinary Parasitology. Disponível em:
<https://www.elsevier.com/journals/veterinary-parasitology/0304-4017/guide-for-authors>

23 **Resumo**

24 O objetivo do estudo foi comparar a eficiência de três técnicas de recuperação de ovos de
25 *Toxocara* spp., a partir de amostras de solo artificialmente e naturalmente contaminadas. Na
26 primeira etapa, amostras de solo (n= 12 amostras de 1g) foram contaminadas com 100 ovos
27 de *T. canis*. Foram utilizadas três técnicas: 1) centrifugo-sedimentação após filtragem do solo
28 em série de quatro tamises (300, 212, 90 e 63 μm); 2) centrifugo-flutuação com sulfato de
29 zinco ($d = 1.35 \text{ g/cm}^3$) após tamisação; e, 3) centrifugo-flutuação com sulfato de zinco sem
30 tamisação. A recuperação de ovos pela técnica 1 foi significativamente superior às demais,
31 com 78,25%; 16,33% e 10,92% de positividade, respectivamente. Na segunda etapa, foram
32 avaliadas amostras de solo de 15 praças e parques públicos de Presidente Prudente, São Paulo,
33 durante um período de 6 meses, com comparação das técnicas 1 e 2. A recuperação de ovos
34 pela técnica 1 mostrou ser mais eficiente. Em três meses avaliados, houve diferença
35 significativa na média dos ovos recuperados. A técnica de tamisação centrifugo-sedimentação
36 mostrou maior eficiência na recuperação de ovos de *Toxocara* spp. em relação as outras
37 técnicas. A técnica é de baixo custo, fácil execução e não requer soluções com riscos
38 ambientais para sua execução.

39 **Palavras-chave:** Contaminação ambiental, Diagnóstico, Larva Migrans, Toxocaríase,
40 Zoonose.

41

42

43

44

45

46

47

48 **Abstract**

49 The objective of this study was to compare the efficiency of different techniques to recover
50 *Toxocara* spp. eggs from artificially and naturally contaminated soil samples. In the first
51 stage, soil samples (n= 12 samples of 1g) were artificially contaminated with 100 eggs of *T.*
52 *canis*. Three techniques were used: 1) centrifugal-sedimentation after soil filtration in a series
53 of four sieves, using distilled water (300, 212, 90, and 63 μm); 2) centrifugal-flotation with
54 zinc sulfate ($d= 1.35 \text{ g/cm}^3$) after sieving; and, 3) centrifugal-flotation with zinc sulfate
55 without sieving. The recovery of eggs using technique 1 was significantly superior to the
56 other techniques, with 78.25%, 16.33%, and 10.92% positivity, respectively. In the second
57 stage, soil samples from 15 public squares/parks were evaluated over a period of 6 months,
58 comparing the more efficient techniques in stage 1 (techniques 1 and 2). The recovery of eggs
59 by technique 1 was more efficient. In the three out of the 6 months evaluated, there was a
60 significant difference in the mean number of eggs recovered, using the technique of
61 centrifugal-sedimentation with sieving. The technique is low cost, easy to implement, and
62 does not require solutions which present environmental risks for its execution.

63 **Key-words:** Diagnosis, environmental contamination, Larva Migrans, Toxocariasis,
64 Zoonosis.

65

66

67

68

69

70

71

72

73 1. Introdução

74 A toxocaríase é uma das cinco zoonoses parasitárias negligenciadas de maior
75 importância no mundo (CDC, 2017). A doença possui ampla distribuição mundial, mas tem
76 maior ocorrência em populações de baixo nível socioeconômico (Won et al., 2008; Santarém
77 et al., 2011) e que vivem em condições de saneamento precárias (Alderete et al., 2003).

78 A principal via de transmissão da toxocaríase humana se dá pela ingestão de ovos
79 infectantes de *Toxocara* spp. no ambiente, particularmente em solo de áreas públicas, onde é
80 comum a presença de crianças (Magnaval et al., 2001), que possuem o hábito de geofagia
81 (Baneth et al., 2016).

82 O homem comporta-se como hospedeiro paratênico, em que o ciclo do parasito não
83 se completa. A toxocaríase humana é classificada nas formas oculta, visceral, ocular e
84 neurotoxocaríase (Rubinsky-Elefant et al., 2010).

85 Os ovos de *Toxocara* spp. em condições ambientais são resistentes (Overgaauw; Van
86 Knapen, 2009), podendo permanecer viáveis no solo por meses a anos, a depender das
87 condições climáticas e a textura do solo (Nunes et al., 1994; Gao et al. 2017; Mizgajska-
88 Wiktor et al., 2017).

89 A presença de ovos de *Toxocara* spp. no solo tem sido observada em diversos países
90 do mundo, incluindo Europa, Ásia e Américas, entre eles o Brasil. Várias técnicas têm sido
91 empregadas para recuperação de ovos, em especial aquelas fundamentadas na centrifugo-
92 flutuação (Oge, Oge, 2000). Todavia, existe uma variação nos protocolos, incluindo as
93 soluções para lavagem do solo, a densidade específica da solução usada para flutuação dos
94 ovos; a força de centrifugação; e, o número de leituras de lâminas (Oge; Oge, 2000; Ruiz de
95 Ybáñez et al., 2000; Coelho et al., 2001; Amoah et al., 2017).

96 Recentemente, alguns estudos têm utilizado tamises de vários diâmetros para
97 filtragem do solo antes do processo de centrifugo-flutuação, para avaliação da contaminação

98 ambiental por ovos de *Toxocara* spp. (Vanhee et al., 2015; Otero et al., 2018). O uso de
99 tamises foi descrito inicialmente para avaliação de contaminação de pêlo de cães por ovos de
100 *Toxocara* spp. (Wolfe; Wright, 2003).

101 No presente estudo, foi avaliada a eficiência de uma técnica de centrifugo-
102 sedimentação após tamisação seriada para recuperação de ovos de *Toxocara* spp. em amostras
103 de solo artificialmente e naturalmente contaminadas, e compará-la com a centrifugo-flutuação
104 com e sem tamisação

105

106 **2. Material e Métodos**

107 O estudo foi realizado em duas etapas. A primeira, avaliou a recuperação de ovos de
108 *Toxocara canis* em solos contaminados experimentalmente com uso de três técnicas.

109 A segunda etapa, constituiu em avaliar solos de praças e parques públicos de
110 Presidente Prudente, com as duas técnicas de melhor desempenho testadas na primeira etapa.

111

112 *2.1 Etapa 1: Contaminação artificial de amostras de solos*

113 Na primeira etapa, foram utilizados para a comparação três técnicas de recuperação
114 de ovos de *T. canis* em amostras de solo contaminadas experimentalmente. 1) Centrifugo-
115 sedimentação após tamisação de solo; 2) Centrifugo-flutuação com sulfato de zinco após
116 tamisação; e, 3) Centrifugo-flutuação com sulfato de zinco.

117 Os ovos de *T. canis* foram obtidos por fêmeas adultas do parasito, recuperadas de
118 filhotes de cães infectados. Em estereomicroscópio, foi realizada a dissecação do terço
119 anterior do útero para a obtenção dos ovos (Fan; Su,2004). Após a recuperação, o material foi
120 armazenado em tubos graduados plásticos, com solução fisiológica e refrigerados.

121 Para a preparação das alíquotas, os ovos foram dispostos em lâminas, pipetados
122 (pipeta de 50 μ l) individualmente e transferidos para microtubos contendo 1,5mL de água
123 destilada.

124 Para cada técnica empregada foram analisadas 12 amostras de 1 g de solo arenoso
125 esterilizado em autoclave (150°C por 30 minutos), contaminadas com 100 ovos de *T. canis*.

126

127 *2.1.1 Técnica de Centrifugo-sedimentação após tamisação de solo*

128 Na técnica de centrifugo-sedimentação, o solo contaminado foi filtrado com a
129 utilização de tamises com malhas de diferentes diâmetros: 300, 212, 90 e 63 μ m.

130 Para filtragem, os tamises foram empilhados e o solo lavado com água corrente
131 durante um minuto. Após lavagem, o material retido na tamis de 63 μ m foi transferido para
132 um tubo graduado de centrifuga de 15 mL. Ao material transferido foi adicionada água
133 destilada em quantidade suficiente para 12 mL. Em seguida, a amostra foi centrifugada (2500
134 r.p.m.= 1090 g; 5 minutos).

135 Após centrifugação, 5 mL do sobrenadante foram descartados e, com auxílio de
136 pipeta de Pasteur, 0,5 mL do sedimento foi transferido para lâminas. Para cada amostra de
137 solo foram avaliadas 3 lâminas sob microscopia ótica (10X).

138 Após a leitura, as etapas de centrifugação e leitura do sedimento foram repetidas
139 mais duas vezes.

140

141 *2.1.2 Técnica de Centrifugo-flutuação após tamisação do solo*

142 O material passou primeiramente pela tamisação descrita na etapa 1. Após lavagem
143 com água, o material retido na tamis de 63 μ m foi transferido para um tubo graduado (15
144 mL).

145 Ao material foi adicionada água destilada em quantidade suficiente para 12 mL. Em
146 seguida, a amostra foi centrifugada (2500 r.p.m.; 5 minutos). Após a centrifugação o
147 sobrenadante foi descartado com pipeta de Pasteur e, foram acrescidos 10 mL de solução de
148 sulfato de zinco ($d=1.350\text{g/cm}^3$). O material foi homogeneizado por 2 minutos seguido por
149 centrifugação (2500 r.p.m.; 5 minutos). Em seguida, com a mesma solução (sulfato de zinco),
150 o tubo foi completado até a formação do menisco e, sobre este, foi disposta uma lamínula. O
151 material ficou em repouso por 5 minutos.

152 Após o período de repouso, a lamínula foi transferida para uma lâmina e, avaliada
153 sob microscopia ótica (10x). Nesta etapa, foram realizadas 3 centrifugações, com a leitura de
154 três lâminas.

155 *2.1.3 Técnica de Centrífugo-flutuação sem tamisação*

156 A terceira técnica utilizada para a recuperação dos ovos, foi a mesma técnica de
157 centrífugo-flutuação com sulfato de zinco descrita anteriormente, sem realização de
158 tamisação.

159

160 *2.2 Etapa 2: Contaminação natural em amostras de solo de praças*

161 A segunda etapa do estudo consistiu na recuperação de ovos de *Toxocara* spp., a
162 partir de amostras de solo de 15 praças públicas de Presidente Prudente, São Paulo. Em cada
163 praça, foram coletadas amostras mensais, durante um período de seis meses consecutivos.

164 Em cada praça, foram coletadas 50g de solo em cinco pontos distintos, totalizando
165 uma amostra de 250g. O solo foi coletado com ajuda de uma pá-de-jardinagem, a uma
166 profundidade de 5,0 a 10,0 cm da superfície, para evitar contaminação por sujidades.

167 Para avaliação da contaminação, foram empregadas as técnicas 1 e 2 descritos na etapa
168 1, com a análise de 10 g de solo de cada praça em cada momento de coleta.

169

170 2.3 Análise dos Resultados

171 Para comparação dos dados, foi utilizada a média das contagens de ovos de cada
172 amostra de solo avaliada.

173 Previamente a análise estatística, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para validar o
174 pressuposto de normalidade de dados pelo qual observou-se que as variáveis estudadas não
175 apresentaram distribuição paramétrica. Para comparar as três técnicas utilizadas na Etapa 1,
176 foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com contrastes pelo método de Student-Newman-
177 Keuls. Para as amostras de solo das praças, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. As análises
178 foram conduzidas no programa R, considerando-se nível de significância de 5% (R
179 Development Core Team, 2017).

180

181 3. Resultados

182 Na tabela 1 estão apresentados os resultados da contagem total e da média de ovos de
183 *Toxocara canis* no solo contaminado experimentalmente, referente às três técnicas testadas na
184 primeira etapa do estudo. A média de recuperação de ovos da técnica de tamisação, seguida
185 da centrifugo-sedimentação foi significativamente superior à técnica de tamisação centrifugo-
186 flutuação ($p= 0,0004$) e da técnica em que foi empregada apenas a centrifugo-flutuação ($p<$
187 $0,0001$). Entretanto, não houve diferença significativa ($p= 0,1943$) quando estas duas últimas
188 foram comparadas.

189 Na etapa 1, houve maior recuperação na técnica de tamisação seguida de centrifugo-
190 sedimentação, variando de 51 a 99 ovos. O número de ovos recuperados pela técnica foi 4,8 e
191 7,2 superiores às observadas com a utilização das técnicas 2 e 3, respectivamente.

192 Na tabela 2, são apresentados os resultados da segunda etapa, referente a recuperação
193 de ovos *Toxocara* spp. em praças e parques públicos.

194 Verificou-se que em todos os meses estudados, o percentual de praças contaminadas
195 e avaliadas pela técnica de tamisação seguido de centrifugo-sedimentação (técnica 1) foi
196 superior ao da técnica tamisação seguido de centrifugo-flutuação (técnica 2), que
197 apresentaram os melhores resultados na primeira etapa.

198 No total, 61,1% (55/90) das amostras de solo na técnica 1, e 26,6% (24/90) da
199 técnica 2 estavam contaminadas com ovos de *Toxocara* spp. A média dos ovos recuperados
200 pela técnica 1 foi superior, sendo que em três meses (janeiro, junho e julho), houve diferença
201 significativa na média dos ovos recuperados.

202 Em alguns meses, não foi possível a detecção de ovos pela técnica 2. Por outro lado,
203 a técnica 1 foi capaz de detectar pelo menos um ovo nas praças, independentemente dos
204 meses estudados, com um mínimo de 46,7% das amostras analisadas.

205

206 **4. Discussão**

207 Recentemente, alguns estudos têm realizado a tamisação de solo seguida pela técnica
208 de centrífugo-flutuação com diversas soluções, em amostras de praças e parques públicos,
209 para recuperação de ovos de *Toxocara* spp (Vanhee et al., 2015; Otero et al., 2018). No
210 presente estudo, foi verificada a influência da tamisação dos ovos de *T. canis* em amostras de
211 solo contaminadas artificialmente e de praças e parques públicos contaminadas naturalmente.

212 A realização de um estudo controlado com solo contaminado artificialmente reduz
213 alguns fatores que podem interferir na recuperação dos ovos, como condições climáticas,
214 textura do solo, contaminantes, e, conseqüentemente, na interpretação dos dados sobre
215 contaminação (Oge; Oge, 2000; Amoah et al., 2017).

216 Na etapa em que se avaliou o estudo controlado, verificamos que o emprego de
217 tamises para filtragem de solo seguido de centrifugo-sedimentação foi superior em relação as
218 outras técnicas. Em alguns testes, verificou-se que quase todos os ovos foram recuperados

219 com análise do sedimento, enquanto nas demais técnicas, o máximo de ovos obtidos foi
220 inferior a 35 ovos.

221 A redução na recuperação de ovos de *Toxocara* spp. pode ser atribuída à
222 irregularidade da membrana dos ovos e sua aderência em materiais plásticos, o que pode
223 reduzir a eficiência da técnica de centrifugo-flutuação, de acordo com Kleine et al. (2016).

224 Em estudo controlado, Santarém et al. (2009) verificaram que a filtragem de solo
225 com a utilização de gaze diminuiu significativamente a recuperação de ovos de *T. canis*. No
226 presente estudo, a filtragem foi realizada com tamises de várias malhas, permitindo a
227 passagem dos ovos e retenção dos mesmos no tamis com 63µm, já previamente utilizado para
228 recuperação de ovos de *T. canis* em amostras de pêlos de cães (Wolfe; Wright, 2003;
229 Meriguetti et al., 2017).

230 Kleine et al. (2016) discutiram a interferência da condutividade elétrica dos reagentes
231 de flutuação sobre a recuperação de ovos de *Toxocara* spp. Dessa forma, essa variável é
232 eliminada com a análise de sedimento para recuperação dos ovos.

233 No nosso estudo, o solo foi lavado diretamente nos tamises sem o uso prévio de
234 detergentes aniônicos. Alguns estudos mostram uma influência positiva dessas substâncias
235 sobre a recuperação de ovos em amostras de solo, especialmente o Tween 40 ou 80 (Kazakos,
236 1983; Oge; Oge, 2000), fato não observado por Santarém et al. (2009), que verificaram que o
237 uso de água ou de Tween 80 ou de hidróxido de sódio resultam em taxas de recuperação de
238 ovos similares. Kleine et al. (2016) observaram em estudo controlado que o uso de
239 detergentes influenciou na recuperação de ovos de *T. cati* mas não para *T. canis*.

240 Outra variável que pode influenciar na viabilidade dos ovos no meio ambiente é a
241 textura do solo. Nunes et al. (1994) observaram que a distribuição de ovos de *Toxocara* spp.
242 são homogêneas em solo arenoso, tipo comum de solo encontrado em Presidente Prudente, de

243 acordo com Santarém et al. (2012), e utilizado no nosso estudo. Contudo, outros estudos são
244 necessários para uma melhor avaliação dessa variável.

245 Em relação à contaminação das praças, observamos que a análise do sedimento
246 seguido de tamisação também foi significativamente superior a técnica de centrifugo-
247 flutuação. Estudos recentes têm empregado a tamisação de solo seguido de centrifugo-
248 flutuação. Vanhee et al. (2015) utilizaram a filtragem com três tamises (300 μm , 125 μm e 50
249 μm) seguido de centrifugo-flutuação com solução de sacarose, e obtiveram 14% de amostras
250 contaminadas em Flandres, na Bélgica. Otero et al. (2018), em Lisboa, Portugal, também
251 utilizaram solução de sacarose para flutuação, obtendo 53% de amostras positivas, com
252 filtragem prévia em 4 tamises (1000 μm , 300 μm , 150 μm e 63 μm).

253 Os estudos sobre contaminação de solo são de difícil comparação, uma vez que
254 existem muitas variáveis relacionadas às técnicas empregadas para recuperação de ovos em
255 amostras ambientais, incluindo o princípio da técnica, a solução empregada para a flutuação e
256 o número de laminas para a leitura (Nunes et al., 1994; Oge; Oge, 2000; Ruiz de Ybáñez et
257 al., 2000; Coelho et al., 2001; Amoah et al., 2017). Além disso, fatores ambientais, como
258 textura de solo, clima, e a presença de cães e gatos, podem também influenciar nos resultados.

259 A técnica de tamisação centrifugo-sedimentação apresentada neste estudo é um
260 método simples, de baixo custo e de fácil execução, com a necessidade apenas de
261 equipamentos básicos, como microscópio e centrifuga. Além disso, dispensa o uso de
262 reagentes para flutuação dos ovos que podem ser considerados como de risco para o ambiente
263 (Kleine et al., 2016). A solução de sulfato de zinco, por exemplo, segundo o fabricante, possui
264 risco aquático e o seu descarte deve ser evitado em redes de água residuais. Além disso, pode
265 ocasionar lesões dermatológicas e oculares durante a sua manipulação.

266 No nosso estudo, não foi utilizado detergente aniônico para lavagem do solo. De
267 acordo com os achados de Kleine et al. (2016), o uso dessas soluções pode influenciar na

268 recuperação de ovos de *T. cati*. Dessa forma, o emprego de detergentes para lavagem de solo
269 deve ser considerado, uma vez que a contaminação por ovos de *T. cati* pode ser importante
270 epidemiologicamente, como observado recentemente em Lisboa, Portugal (Otero et al., 2018).

271 Apesar das vantagens apresentadas na técnica de tamisação seguida pela centrifugo-
272 sedimentação, a leitura do sedimento é laborosa e pode requerer treinamento do laboratorista
273 para evitar confundimento com artefatos ambientais que se assemelhem aos ovos de
274 nematódeos.

275

276 **5. Conclusão**

277 A técnica de tamisação centrifugo-sedimentação apresentada neste estudo é uma
278 alternativa simples, de baixo custo e, de fácil execução para recuperação de ovos de *Toxocara*
279 spp. no solo.

280

281 **Agradecimentos**

282 Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
283 (CAPES), pela concessão de taxa de Pós-Graduação a A.S. Batista.

284

285 **Referências**

286 Alderete, J.M., Jacob, C.M.A., Pastorino, A.C., Elefant, G.R., Castro, A.P.M., Fomin, A.B.F.,
287 Chieffi, P.P., 2003. Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butantã
288 Region, São Paulo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98, 593-597.

289 Amoah, I.D., Singha, G., Stenströma, T.A., Reddy, P., 2017. Detection and quantification of
290 soil-transmitted helminths in environmental samples: A review of current state-of-the-art and
291 future perspective. Acta Trop., 169, 187-201.

- 292 Baneth, G., Thamsborg, S.M., Otranto, D., Guillot, J., Blaga, R., Deplazes, P., Solano-
293 Gallego, L., 2016. Major Parasitic Zoonoses Associated with Dogs and Cats in Europe. J.
294 Comp. Pathol., 155, 54-74.
- 295 CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2017. Neglected Parasitic Infections
296 (NPIs) in the United States. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/npi/index.html>.
297 Acesso em: 1 de março de 2018.
- 298 Coelho, L.M.P.S., Dini, C.Y., Milman, M.H.S.A., Oliveira, S.M., 2001. *Toxocara* spp. eggs in
299 public squares of Sorocaba, São Paulo state, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 43, 189-
300 191.
- 301 Fan, C.-K., Su, K.-E., 2004. Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice
302 infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol. Int., 53,
303 263-271.
- 304 Gao, X., Wang, H., Li, J., Oin, H., Xiao, J., 2017. Influence of land use and meteorological
305 factors on the spatial distribution of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in soil in urban
306 areas. Vet. Parasitol, 233, 80-85.
- 307 Kazacos, K.R., 1983. Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from
308 soil associated with epizootics and during survey studies. Am. J. Vet. Res., 44, 896-900.
- 309 Kleine, A., Janecek, E., Waindok, P., Strube, C., 2016. Flotation and adherence characteristics
310 of *Toxocara canis* and *T. cati* and a reliable method for recovering *Toxocara* eggs from soil.
311 Vet. Parasitol., 227, 35–41.
- 312 Magnaval, J.F., Glickman, L.T., Dorchies, P., Morassin, B., 2001. Highlights of human
313 toxocariasis. Korean J. Parasitol. 39, 1–11.

- 314 Merigueti, Y.F.F.B., Santarém, V.A., Ramires, L.M., Batista, A.S., Beserra, L.V.C., Nuci,
315 A.L., Esposte, T.M.P., 2017. Protective and risk factors associated with the presence of
316 *Toxocara* spp. eggs in dog hair. *Vet. Parasitol.*, 244, 39–43.
- 317 Mizgajska-Wiktor, H., Jarosz, W., Fogt-Wyrwas, R., Drzewiecka, A., 2017. Distribution and
318 dynamics of soil contamination with *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in Poland and
319 prevention measures proposed after 20 years of study. *Vet. Parasitol.*, 234, 1-9.
- 320 Nunes, C M., Sinhorini, I. L., Ogassawara, S., 1994. Influence of soil texture in the recovery
321 of *Toxocara canis* eggs by a flotation method. *Vet. Parasitol.*, 53, 269-274.
- 322 Oge, H., Oge, S., 2000. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of
323 *Toxocara canis* in samples of sand. *Vet. Parasitol.*, 92, 75-79.
- 324 Overgaaauw, P.A., Van Zutphen, L., Hoek, D., Yaya, F.O., Roelfsema, J., Pinelli, E., Van
325 Knapen, F., Kortbeek, L.M., 2009. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and
326 cats in The Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 163, 115–122.
- 327 Otero, D., Alho, A.M., Nijse, R., Roelfsema, J., Overgaaauw, P., Madeira de Carvalho, L.,
328 2018. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground
329 sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *J. Infect Public Health*, 11, 94-98.
- 330 R Development Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing.
331 R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. The R Foundation for Statistical
332 Computing. 2016. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 30 de janeiro de
333 2018.

- 334 Rubinsky-elefant, G., Hirata, C.E., Yamamoto, J.H., Ferreira, M.U., 2010. Human
335 toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic
336 and ocular forms. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 104, p. 3-23.
- 337 Ruiz de ybáñez, M.R., Garijo, M., Goyena, M., Alonso, F.D., 2000. Improved methods for
338 recovering eggs of *Toxocara canis* from soil. *J. Helminthol.*, 74, 349-53.
- 339 Santarém, V. A., Magoti, L.P., Sichieri, T.D., 2009. Influence of variables on centrifuge-
340 flotation technique for recovery of *Toxocara canis* eggs from soil. *Vet. Inst. de Med. Trop. S.*
341 *Paulo*, 51, 163-167.
- 342 Santarém, V.A., Leli, F.N.C., Rubinsky-elefant, G., Giuffrida, R., 2011. Protective and risk
343 factors for toxocariasis in children from two different social classes of Brazil. *Ver. Inst. Med.*
344 *Trop. S. Paulo*, 53, 67-72.
- 345 Santarém, V.A., Pereira, V.C., Porto Alegre, B.C., 2012. Contamination of public parks in
346 Presidente Prudente (São Paulo, Brazil) by *Toxocara* spp. eggs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 21,
347 323-325.
- 348 Vanhee, M., Dalemans, A.C., Viaene, J. Depuydt, L., Claerebout, E., 2015. *Toxocara* in
349 sandpits of public playgrounds and kindergartens in Flanders (Belgium). *Vet. Parasitol.*, 1-2,
350 51-54.
- 351 Wolfe, A., Wright, I.P., 2003. Human toxocariasis and direct contact with dogs. *Vet. Record*,
352 152, 419-422.
- 353 Won, K. Y., Kruszon-Moran, D., Schantz, P.M., Jones, J.L., 2008. National seroprevalence
354 and risk factors for Zoonotic *Toxocara* spp. *Infection. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79, 552-557.

355 **Tabela 1.** Número de ovos de *Toxocara canis* recuperado em solo (1 g) contaminado
 356 experimentalmente (n=12) através das técnicas de tamises seguido de sedimentação, tamises
 357 seguido de centrifugo-flutuação com sulfato de zinco ($d=1.35 \text{ g/cm}^3$), e de centrifugo-
 358 flutuação com sulfato de zinco ($d=1.35 \text{ g/cm}^3$).

359

Técnicas de recuperação de ovos de <i>Toxocara canis</i>			
Teste	Tamises/ Sedimentação	Tamises/ Centrifugo-flutuação	Centrifugo-flutuação
1	76	13	9
2	97	16	12
3	56	12	22
4	89	14	1
5	68	11	4
6	92	12	9
7	99	19	34
8	45	16	0
9	85	12	17
10	88	31	14
11	93	22	4
12	51	18	5
Média±dp	78,25±18,83 ^A	16,33±5,71 ^B	10,92±9,81 ^B

360 - Para cada teste foram avaliadas três leituras, com três repetições.

361 - dp: desvio-padrão

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375 **Tabela 2.** Comparação entre técnicas de recuperação de ovos de *Toxocara* spp. em amostras
 376 de solo (n=15) de praças públicas contaminadas naturalmente

Praças	Meses											
	1		2		3		4		5		6	
	Técnicas I	Técnicas II	Técnicas I	Técnicas II	Técnicas I	Técnicas II	Técnicas I	Técnicas II	Técnicas I	Técnicas II	Técnicas I	Técnicas II
1	3	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
3	2	1	0	1	1	0	4	0	1	0	1	0
4	4	0	5	1	1	1	1	1	1	0	1	0
5	1	0	1	2	0	0	0	0	1	0	2	0
6	1	1	2	3	2	0	0	1	1	0	1	0
7	3	0	2	0	1	7	1	2	0	0	0	0
8	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
10	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
11	3	1	2	0	3	1	1	0	0	0	0	0
12	1	1	1	0	0	0	4	0	1	0	0	0
13	1	1	1	2	2	0	0	1	0	0	1	0
14	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0
15	2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Total	24	8	21	11	13	10	13	6	7	0	10	0
%	80,0	46,7	73,3	53,3	60,0	26,7	46,7	33,3	46,7	0,0	60,0	0,0
Média	1,6	0,5	1,4	0,7	0,9	0,7	0,9	0,4	0,5	0,0	0,7	0,0
Valor <i>p</i>	0,00811*		0,0733		0,0599		0,2340		0,0147*		0,0026*	

377

378

379

380

381

382

383

384

385 **HIGHLIGHTS (DESTAQUES)**

386

387 - Técnicas para recuperação de ovos de *Toxocara* spp. em solo

388 - Solo contaminado artificialmente e de praças públicas

389 - Tamisação e análise de sedimento com alta recuperação de ovos

390 - Técnica de fácil execução e baixo custo

391

392

393