

LIMIAR DE DETECÇÃO DE LARVAS DE *Toxocara canis* EM LEITE BOVINO
EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADO

Edlayne Larissa Gretter Machado Pereira

**LIMIAR DE DETECÇÃO DE LARVAS DE *Toxocara canis* EM LEITE BOVINO
EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADO**

Edlayne Larissa Gretter Machado Pereira

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

636.214 2 Pereira, Edlayne Larissa Gretter Machado.
P436l Limiar de detecção de larvas de *Toxocara canis*
em leite bovino experimentalmente contaminado /
Edlayne Larissa Gretter Machado Pereira –
Presidente Prudente, 2015.
30 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientador: Vamilton Alvares Santarém

1. Toxocaríase. 2. Recuperação de larvas. 3.
Diagnóstico. I. Título.

EDLAYNE LARISSA GREYTER MACHADO PEREIRA

**LIMIAR DE DETECÇÃO DE LARVAS DE *Toxocara canis* EM LEITE BOVINO
EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADO**

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, 27 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Daniela Dib Gonçalves
Universidade Paranaense – UNIPAR
Umuarama-PR

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE
Presidente Prudente- P

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, pois me incentivaram, sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis, me apoiando para seguir em frente e nunca desistir dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A minha querida e amada família em especial ao meu marido Artur Francisco de Moura Pereira por sempre ter uma palavra de carinho e motivação nas horas difíceis e a minha querida filha Marina Machado Pereira, meu grande incentivo para nunca desistir.

Aos meus pais Francisco Benedito Machado e Liamar Ap. Gretter Machado, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo e a minha irmã Rafaela Gretter Machado por sempre estar ao meu lado.

A minha prima Amanda Gretter Frias e minha tia Célia Regina Gretter Frias que me incentivaram a seguir o caminho da vida acadêmica.

A minha tia Aurinete Machado Videira que me auxiliou muito com os cuidados e carinhos extra a minha filha Marina enquanto eu estudava.

Ao Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém meu querido orientador por acreditar e confiar na minha capacidade no desenvolvimento deste projeto, contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

Às companheiras Aline da Silveira Batista, Médica Veterinária Residente e Yslla Fernanda Fitz Balo Merigueti, acadêmica de Medicina Veterinária da Unoeste, que fizeram parte desses momentos, sempre me ajudando, incentivando, e ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva II do Hospital Veterinário da Unoeste onde todo o projeto foi desenvolvido.

“O homem não teria alcançado o possível, se inúmeras vezes não tivesse tentado atingir o impossível”. (Max Weber)

RESUMO

Limiar de detecção de larvas de *Toxocara canis* em leite bovino experimentalmente contaminado

O objetivo do estudo foi avaliar o limiar de detecção de larvas de *Toxocara canis* em leite bovino comercial contaminado experimentalmente, a partir de uma técnica de centrifugo-sedimentação. Primeiramente, amostras de leite bovino comercial (integral e desnatado) foram contaminadas com 50 larvas de *T. canis*, para avaliação da interferência da gordura sobre a recuperação das larvas. Em uma segunda etapa, foi avaliada a ação de formalina 10% (100 µL), éter (100 µL) e combinação das soluções. A terceira etapa consistiu da verificação do limite de detecção de larvas, com uso da melhor solução desengordurante (etapa 2), em amostras de leite (1,0 mL) contendo 1; 5; 10; 25 e 50 larvas. Para cada análise de detecção do leite (1,0 mL), foram realizadas 15 repetições. Foi observado que o percentual de recuperação de larvas no leite desnatado foi significativamente maior ($p= 0,0031$) que o observado no leite integral. Na comparação das soluções, não houve diferença significativa ($p= 0,5681$) no percentual de larvas recuperadas. Entretanto, houve uma maior recuperação quando do emprego da combinação de formol-éter (73,1%) em relação ao éter (71,9%), leite integral puro (70,0%) e ao formol (67,6%). Em relação ao limite de detecção, com uso de formalina-éter, todas as alíquotas apresentaram resultado positivo (mínimo de 62,7% de larvas recuperadas), para as amostras com 5, 10, 25 e 50 larvas. Nas amostras contaminadas com uma larva, 66,7% das alíquotas foram positivas. A técnica apresentada poderá servir para recuperação de larvas de *Toxocara* spp. em amostras de leite de várias espécies animais, contaminados naturalmente ou experimentalmente.

Palavras-chave: toxocaríase, recuperação de larvas, diagnóstico, transmissão.

ABSTRACT

Limit of detection of *Toxocara canis* larvae in experimentally contaminated bovine milk

This study aimed to evaluate the limit of detection of *Toxocara canis* larvae in experimentally contaminated commercial bovine milk, based on a centrifuge-sedimentation technique. Firstly, bovine milk (integral and skim) samples were contaminated with 50 *T. canis* larvae, in order to evaluate the interference of milk fat on the recovery of the larvae. The second step of the study was to verify the influence of formalin 10% (100 μ L), ether (100 μ L) and combination of both solutions. The third step consisted of studying the limit of detection of larvae, using the best solution (step 2) for degreasing the milk. Samples were contaminated with aliquots of 1; 5; 10; 25 and 50 larvae. For each milk sample (1.0 mL), 15 repetitions were analyzed. It was observed that the recovery of the larvae from the skim milk was higher ($p= 0.0031$) than those from the integral milk. There was no significant difference ($p= 0.5681$) regarding the percentage of recovered larvae in comparing the degreasing solutions. Nevertheless, the formalin-ether combination was more efficient to recover the larvae (73.1%) in comparison to the ether (71.9%), the pure integral milk (70.0%) as well as the formalin (67.6%). Concerned to the limit of detection (using formalin-ether), all the samples contaminated with 5; 10; 25 and 50 larvae were positive (minimum: 62.7%). The samples contaminated with a single larva, 66.7% were positive. The technique may be useful for recovering *Toxocara* spp. larvae in milk samples of a wide range of animal species, either naturally or experimentally contaminated.

Keywords: Toxocariasis, recovery of larvae, diagnosis, transmission.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

® - Marca Registrada

% – Por cento

µL – Microlitro

força *g* – força centrífuga

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

mL – Mililitro

N – Normal

ANOVA – Análise de Variância

PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)

UHT – “Ultra High Temperature” (ultrapasteurização)

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTIFICO.....	10
	ANEXOS.....	26
	ANEXO 1 ICROFOTOGRAFIA DE LÁRVAS DE <i>TOXOCARA CANIS</i> RECUPERADAS (SETA) EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO DESNATADO (A) E INTEGRAL (B) ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS. NA FIGURA B, PODE-SE OBSERVAR A PRESENÇA DE GOTÍCULAS DE GORDURA PROVENIENTE DO LEITE.....	27
	ANEXO 2 TÉCNICA UTILIZADA PARA RECUPERAÇÃO DE LÁRVAS DE <i>TOXOCARA CANIS</i> EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS.....	28

1 ARTIGO CIENTÍFICO*

Limiar de detecção de larvas de *Toxocara canis* em leite bovino experimentalmente contaminado

Limit of detection of *Toxocara canis* larvae in experimentally contaminated bovine milk

Edlayne Larissa Gretter Machado Pereira¹, Vamilton Alvares Santarém^{2}, Aline da Silveira Batista², Yslla Fernanda Fitz Balo Merigueti², Lundia Luara Cavalcante Bin¹**

¹ Post-Graduate Program in Animal Science. Laboratory of Veterinary Parasitology, Veterinary Teaching-Hospital (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

² Laboratory of Veterinary Parasitology, Veterinary Teaching-Hospital, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

Abstract

This study aimed to evaluate the limit of detection of *Toxocara canis* larvae in experimentally contaminated commercial bovine milk, based on a centrifuge-sedimentation technique. Firstly, bovine milk (integral and skim) samples were contaminated with 50 *T. canis* larvae, in order to evaluate the interference of milk fat on the recovery of the larvae. The second step of the study was to verify the influence of formalin 10% (100 µL), ether (100 µL) and a combination of both solutions. The third step consisted of studying the limit of detection of larvae, using the best solution (from step 2) for degreasing the milk. Samples were contaminated with aliquots of 1; 5; 10; 25 and 50 larvae. For each milk sample (1.0 mL), 15 repetitions were analyzed. It was observed that the recovery of the larvae from the skim milk was higher ($p=0.0031$) than that from the integral milk. There was no significant difference ($p=0.5681$) regarding the percentage of recovered larvae when comparing the degreasing solutions. Nevertheless, the formalin-ether combination was more efficient for recovering the larvae (73.1%) in comparison to the ether (71.9%), the pure integral milk (70.0%) and the formalin (67.6%). Concerning the limit of detection (using formalin-ether), all the samples contaminated with 5; 10; 25 and 50 larvae were positive (minimum: 62.7%). In the samples contaminated with a single larva, 66.7% were positive. The technique may be useful for recovering *Toxocara* spp. larvae in milk samples from a wide range of animal species, either naturally or experimentally contaminated.

Key words: Toxocariasis, recovery of larvae, diagnosis, transmission.

* Normas da Revista Semina: Agrárias.

<http://www.uel.br/portal/frm/frmOpcao.php?opcao=http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias>

** Autor para correspondência: Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares Km 572, Bairro Limoeiro - Presidente Prudente, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil. Tel/Fax: +55 18 3229 2077 E-mail: vamilton@unoeste.br

Resumo

O objetivo do estudo é o de avaliar o limiar de detecção de larvas de *Toxocara canis* em leite bovino comercial contaminado experimentalmente, a partir de uma técnica de centrifugo-sedimentação. Primeiramente, amostras de leite bovino comercial (integral e desnatado) foram contaminadas com 50 larvas de *T. canis*, para avaliação da interferência da gordura sobre a recuperação das larvas. Em uma segunda etapa, foi avaliada a ação de formalina 10% (100 µL), éter (100 µL) e combinação das soluções. A terceira etapa consistiu da verificação do limite de detecção de larvas, com uso da melhor solução desengordurante (etapa 2), em amostras de leite (1,0 mL) contendo 1; 5; 10; 25 e 50 larvas. Para cada análise de detecção do leite (1,0 mL), foram realizadas 15 repetições. Foi observado que o percentual de recuperação de larvas no leite desnatado foi significativamente maior ($p= 0,0031$) que o observado no leite integral. Na comparação das soluções, não houve diferença significativa ($p= 0,5681$) no percentual de larvas recuperadas. Entretanto, houve uma maior recuperação quando do emprego da combinação de formol-éter (73,1%) em relação ao éter (71,9%), ao leite integral puro (70,0%) e ao formol (67,6%). Em relação ao limite de detecção, com uso de formalina-éter, todas as alíquotas apresentaram resultado positivo (mínimo de 62,7% de larvas recuperadas), para as amostras com 5, 10, 25 e 50 larvas. Nas amostras contaminadas com uma larva, 66,7% das alíquotas foram positivas. A técnica apresentada poderá servir para recuperação de larvas de *Toxocara* spp. em amostras de leite de várias espécies animais, contaminados naturalmente ou experimentalmente.

Palavras-chave: toxocaríase, recuperação de larvas, diagnóstico, transmissão.

1. Introdução

A toxocaríase é uma zoonose causada principalmente pelo nematódeo *Toxocara canis*, cujo hospedeiro definitivo é o cão (DESPOMMIER, 2003; SANTARÉM et al., 2011). A toxocaríase é uma das mais prevalentes helmintozoonoses (RUBINSKY-ELEFANT et al., 2010).

No homem, que se comporta como hospedeiro paratênico, as larvas durante sua migração podem ocasionar vários distúrbios, incluindo problemas pulmonares (GUNERATE et al., 2011; GUILHERME et al., 2013; RANASURIVA et al., 2014; PARK et al., 2014), hepáticos (LIM, 2010; CHOI et al., 2012; COSKUN; AKINCI, 2013; RAMACHANDRAN et al., 2013; JANG et al., 2014; KANG et al., 2014) cardíacos (KIM et al., 2012; LEMAIRE et al., 2014; PARK et al., 2014), renais (CERRUTO; D'ELIA; ARTIBANI, 2013), dermatológicos (KIM et al., 2010; BELLANGER et al., 2011) e urinário (KANG et al., 2014).

Outros sinais clínicos envolvem distúrbios neurológicos, caracterizando a neurotoxocaríase (NOH et al., 2012; QUATTROCCHI et al., 2012; CHOI et al., 2013; ZIBAEI et al., 2013), ou oftálmicos, característicos da forma ocular da doença (PIVETTI-PEZZI, 2009; AZIRA; ZEEHAIDA, 2011; VAN DE et al., 2013; AHN et al., 2014; KANG, LEE, 2015).

O diagnóstico da doença no ser humano é realizado principalmente pela detecção de anticorpos anti*Toxocara* pelo teste de ELISA. Estudos soroepidemiológicos têm mostrado que existe uma variação de 13,3% a 92,8% entre os continentes das Américas, África, Ásia e Europa. Em algumas regiões no Brasil, possuem uma variação considerada entre 11,1% a 38,8% de soroprevalência (RUBINSKY-ELEFANT et al., 2010). Em Fernandópolis, São Paulo, foi verificada soroprevalência de 15,5%, em indivíduos entre 1 a 12 anos (CASSENOTE et al., 2014).

A transmissão de *T. canis* no cão ocorre principalmente pela via transplacentária (DESPOMMIER, 2003), mas se dar também pela via transmamária (SANTARÉM et al., 2014), ingestão de ovos larvados presentes no meio ambiente e, ainda, pela ingestão de hospedeiros paratênicos (MAGNAVAL et al., 2001). A transmissão de *T. canis* ao ser humano pode acontecer pela ingestão acidental de solo contendo ovos larvados, de carne crua ou mal cozida de hospedeiros paratênicos (MAGNAVAL et al., 2001; DESPOMMIER, 2003). Existe um relato de toxocaríase ocular congênita em um recém-nascido prematuro, descrito na Argentina (MAFFRAND et al., 2006).

Alvarado-Esquivel (2013), no México, observou uma associação entre toxocaríase e o consumo de leite caprino *in natura*, em população adulta. Na literatura científica consultada, porém, não foram registrados dados sobre a transmissão de larvas de *Toxocara* spp. pelo leite materno.

Estudos com modelos experimentais têm confirmado a transmissão de larvas de *Toxocara* pela via transmamária a partir de amostras de tecido de camundongos neonatos (REITEROVÁ; TOMASOVICOVÁ; DUBINSKÝ, 2003; JIN; AKAO; OHTA, 2008; DE SOUZA AGUIAR et al., 2014) e com 50 dias de idade (TELMO et al., 2015), e diretamente do leite de coelhas (SANTARÉM et al., 2014). Entretanto, o limiar da técnica apresentada por esse último estudo, para detecção das larvas, não foi avaliado.

Desta forma, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o limiar de detecção de larvas de *T. canis* com emprego de técnica de centrifugo-sedimentação, utilizando o leite bovino como modelo experimental.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção e incubação de ovos de *Toxocara canis*

Os ovos utilizados no estudo foram obtidos de fêmeas adultas (larvas de quinto estágio - L₅) de *T. canis*, que foram liberadas espontaneamente por filhotes de cães naturalmente infectados, mantidos no Canil da Unoeste (Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente/SP). As L₅ foram

acondicionadas em recipientes plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva II (Parasitologia Veterinária) do Hospital Veterinário da mesma instituição.

Inicialmente, os parasitos foram expostos a uma solução de hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos e lavados com solução fisiológica, para retirada de debris. Logo após, foram dissecados no terço anterior do útero para extração dos ovos (FAN; SU, 2004).

Para embrionamento, foi utilizada a solução de ácido sulfúrico 0,1N (proporção 1:10), e incubação em estufa ($27\pm 3^{\circ}\text{C}$), por um período mínimo de 28 dias.

A avaliação da embriogênese e de larvas no interior dos ovos foi realizada periodicamente em microscopia óptica (10X).

2.2 Obtenção de larvas de *Toxocara canis*

Para obtenção de larvas de *T. canis*, foi utilizada a técnica de Baerman, com pequenas modificações.

Alíquotas do material contendo os ovos lavados (aproximadamente 1,0 mL) foram transferidas em tubo cônico e submetidas à centrifugação (1428 x g, 5 minutos), para retirada do ácido sulfúrico. Depois da retirada do sobrenadante contendo o ácido, o material foi lavado com 5,0 mL de água destilada e centrifugado mais duas vezes (1428 x g, 5 minutos).

Após a lavagem, o sedimento contendo os ovos foi transferido para uma placa de Petri, contendo 5,0 mL de solução de hipoclorito de sódio a 5%, para fragilização da membrana dos ovos e eclosão das larvas, onde permaneceu por 3 minutos. Seguindo, o material sofreu nova centrifugação para retirada de hipoclorito e duas lavagens em água destilada (1428 x g, 5 minutos).

Os tubos foram aquecidos (37°C ; 10 minutos) e pérolas de vidro foram colocadas no tubo para auxiliar no processo de rompimento dos ovos. O material foi colocado a vórtex (2 minutos), homogeneizado (15 minutos) e submetido a banho-maria (37°C ; 10 minutos).

O material foi colocado sobre uma gaze disposta em um aparato de Baermann, onde permaneceu por 12 horas. Após esse período, as larvas recuperadas foram armazenadas sob refrigeração (7°C), até o momento de separação e contagem para formação de alíquotas.

2.3 Formação de alíquotas

Para preparo das alíquotas contendo os ovos, 10,0 μL do material resultante do Baermann foram dispostos em lâmina histológica. As larvas foram contadas (microscopia ótica 4X) e, com auxílio de pipeta (20,0 μL), aspiradas individualmente e transferidas para microtubos tipo Eppendorf contendo 200 μL de água destilada. Foram formadas alíquotas de 1, 5, 10, 25 e 50 larvas.

2.4 Contaminação e recuperação de larvas de *T. canis* em amostras de leite

No estudo foi empregado leite bovino “longa vida” UHT (ultrapasteurização), dos tipos desnatado (Molico[®], Nestlé) e integral (Ninho[®], Nestlé), com teor de gordura de 0,4% e 3,5%, respectivamente, de acordo com a composição indicada pelo fabricante.

O processo de recuperação das larvas foi realizado tendo como base a técnica do formol-éter descrita por Ritchie (1948), utilizada por Santarém et al. (2014), com pequenas modificações, para recuperação de larvas de *T. canis* em leite de coelhas infectadas experimentalmente.

No presente estudo, foi padronizado o volume de 1,0 mL de leite para cada alíquota testada. A amostra de leite foi transferida para tubo cônico de centrifuga e sofreu adição das alíquotas contendo as larvas.

Para recuperação das larvas, foram adicionados 100 µL de solução de formol a 10% ao leite e o material foi levemente homogeneizado, permanecendo em repouso por 2 minutos. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de éter etílico, com homogeneização e repouso (2 minutos). Após esse processo, as amostras foram centrifugadas (1428 x g, 5 minutos).

Para contagem das larvas, seis alíquotas de 50,0 µL foram retiradas do sedimento e analisadas entre lamina e lamínula (22X22 mm) sob microscopia ótica (10x).

Uma segunda leitura de seis alíquotas foi novamente avaliada, após leve homogeneização e centrifugação (1428 x g, 5 minutos)

2.5 Etapas de Avaliação

2.5.1 Interferência da gordura sobre a recuperação das larvas

Inicialmente, para avaliação da interferência da gordura do leite sobre a recuperação de larvas, foram avaliadas alíquotas de leite desnatado e de leite integral, contaminadas com 50 larvas.

2.5.2 Interferência das soluções sobre a recuperação das larvas

O segundo passo do estudo foi avaliar se as soluções apresentaram interferência na recuperação das larvas. Foram comparadas as contagens das larvas recuperadas (15 alíquotas) em amostras contendo 50 larvas, a partir do tratamento do leite com formalina 10%, com éter etílico 70%, com formalina-éter e apenas com leite integral, que foi utilizado como controle.

2.5.3 Limite de detecção de recuperação das larvas no leite

A última etapa consistiu em estudar o limiar de detecção das larvas no leite. A partir da técnica que apresentou os melhores resultados nas etapas anteriores da (1 e 2), foi avaliada em graduação decrescente a recuperação em alíquotas contendo 50, 25, 10, 5 e 1 larva/mL de leite.

2.6 Controle

Uma amostra de 1,0 mL de leite integral UHT foi utilizada como controle e submetida ao mesmo procedimento adotado para aquelas que sofreram contaminação. Para cada partida de repetição testada com as diferentes alíquotas de larvas, uma amostra controle foi avaliada.

2.7 Análise Estatística

Para cada análise de detecção, foram avaliadas 15 alíquotas, definidas a partir de um estudo prévio. Foi considerada a recuperação de pelo menos 50% das larvas nos estudos com 10, 25 e 50 larvas, para inclusão das alíquotas no estudo.

O pressuposto de normalidade dos dados foi avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk.

Para comparação do percentual médio do número de larvas recuperadas no leite desnatado e no leite integral, foi utilizado o teste t não pareado. A Análise de Variância (ANOVA- uma via) foi utilizada para comparação do percentual do número de larvas quando do emprego das soluções de formalina 10%, éter etílico 70%, associação das duas soluções e do leite integral puro.

Para todas as análises, adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados

De acordo com os resultados obtidos na primeira etapa do estudo (Tabela 1), o percentual de recuperação de larvas no leite desnatado foi significativamente maior ($p = 0,0031$) que aquele observado no leite integral, com 81,2% e 70,0%, respectivamente.

Em relação às soluções utilizadas, não houve diferença significativa ($p = 0,5681$) no percentual de larvas recuperadas, incluindo as amostras processadas com leite utilizado como controle (Tabela 2). Entretanto, houve uma maior recuperação quando do emprego da combinação de formol-éter (73,1%) em relação ao éter (71,9%), ao leite controle (70,0%) e ao formol (67,6%). Dessa forma, para avaliação do limite de detecção das larvas, foi empregada a solução de formalina-éter.

Considerando-se as alíquotas contendo de 50 a 5 larvas, a técnica adotada com uso de formalina-éter permitiu a recuperação de pelo menos uma larva em todos os testes. Nas amostras com

uma larva, a positividade foi de aproximadamente 67%, o que representou 33% de resultados falso-negativos.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, verificou-se que em todos os testes houve recuperação de larvas, com exceção das amostras contaminadas com uma larva, onde 10 das 15 (66,7%) alíquotas apresentaram resultado positivo. Em relação ao percentual médio, observou-se que em todos os testes houve pelo menos 62,7% de larvas recuperadas.

Não foram observadas alterações na integridade das larvas. Entretanto, a maioria delas apresentava-se imóvel, quando submetidas às soluções empregadas na técnica de centrifugo-sedimentação. Por outro lado, todas as larvas recuperadas no leite integral puro mantiveram sua motilidade. Verificou-se ainda que as larvas que sofreram ação da formalina estavam, em sua maioria, de forma espiralada, enquanto que aquelas submetidas apenas ao éter estavam esticadas. Quando do emprego da associação de ambas as soluções, aproximadamente metade das larvas estava espiralada e metade esticada.

Nenhuma larva foi encontrada nas amostras controle.

4. Discussão

No presente estudo, foi possível verificar que a recuperação de larvas no leite desnatado foi maior que no integral. Nas leituras das amostras com leite integral foi observada quantidade de gordura que provavelmente dificultou a leitura, diferentemente das amostras de leite desnatado, em que havia pouca quantidade de gordura que interferisse na observação das larvas. Provavelmente, as larvas ficaram retidas na gordura e reduziram a recuperação, como foi considerado por Santarém et al. (2014).

Uma técnica de centrifugo-sedimentação foi utilizada para recuperação das larvas. Para avaliar a influência das soluções (formalina-éter, formol e éter), as mesmas foram comparadas separadamente e em associação. Observou-se que embora não tenha havido diferença significativa na recuperação, a associação formalina-éter apresentou o melhor resultado. Provavelmente, a ação do éter e da formalina permitiu maior lipólise, fato confirmado durante a análise das alíquotas, quando da presença de gotículas de gordura, o que resultou em liberação das larvas. A recuperação de larvas no leite integral puro mostrou que a centrifugação por si só possibilitou a sedimentação das larvas.

Em virtude do resultado obtido com a formalina-éter, essa solução foi adotada para avaliar o limite de detecção da técnica de centrifugo-sedimentação.

No nosso estudo foi adotada a solução de formalina-éter em virtude de uma maior recuperação de larvas. A técnica empregada permitiu uma recuperação considerável de larvas mesmo em amostras contaminadas com uma larva. Verificou-se que a técnica apresentada pode ser utilizada tanto para estudos quantitativos, em animais infectados experimentalmente com uma dose infectante

predefinida, e também empregada de forma qualitativa, em animais com infecção natural, uma vez que a quantidade dessas estruturas parasitárias não é conhecida.

No presente estudo, a integridade das larvas submetidas às substâncias utilizadas para desengordurar o leite foi mantida. Porém, foi verificada a presença de larvas espiraladas no leite submetido à formalina-éter, coincidindo com os achados de Santarém et al. (2014), no leite de coelhas infectadas experimentalmente. Embora a presença de larvas espiraladas possa ser uma limitação para a caracterização morfométrica quando do emprego da formalina-éter, foi possível a recuperação de um número suficiente de larvas que permitiram a morfometria. Dessa forma, pode ser possível a classificação do gênero de ascarídeo recuperado a partir do leite de animais infectados naturalmente. Além disso, o uso de técnicas moleculares provavelmente não deve sofrer interferência para a caracterização das larvas. Novos estudos são necessários para avaliar soluções que permitam a quebra das moléculas de gordura no leite e que não interfiram na morfometria das larvas.

A técnica de centrifugo-sedimentação apresentada no presente estudo além de permitir a recuperação de larvas em amostras com pequeno número dessas estruturas apresentou facilidade e baixo consumo de tempo para sua execução, necessidade de reagentes e equipamentos de baixo custo.

Em virtude da liberação de várias espécies de ascarídeos no leite, a técnica apresentada poderá servir para recuperação de larvas e complementada com técnicas para caracterização molecular dos parasitos. A PCR tem servido para caracterização molecular a partir de amostras de fezes de cães e gatos e de solo contendo ovos de *Toxocara* spp. (FOGT-WYRWAS et al., 2007; FAHRION et al., 2011; DURANT et al., 2012; KHADEM VATAN et al., 2013; KHADEM VATAN et al., 2014). A técnica foi empregada em estudo experimental para avaliação de lavado broncoalveolar (PINELLI et al., 2013) e ainda para confirmação do diagnóstico da toxocaríase humana, como causa de síndrome neurológica, a partir de amostras de líquido (CALDERA et al., 2012) e para caracterização molecular de uma larva de *Toxocara*, identificada como *T. canis*, presente no olho esquerdo de um homem com queixa de perda de visão e dor ocular (VAN DE et al., 2013).

Em conclusão, a técnica foi capaz de detectar larvas em amostras de leite com baixo número de larvas de *Toxocara* spp., com limiar de detecção de pelo menos uma larva. A técnica apresentada nesse estudo poderá servir para a avaliação da transmissão transmamária desses nematódeos em várias espécies animais, quer sejam contaminados naturalmente ou experimentalmente.

5. Referências

- AHN, S.J.; WOO, S.J.; JIN, Y.; CHANG, Y.-S.; KIM, T.W.; AHN, J.; HEO, J.W.; YU, H.G.; CHUNG, H.; PARK, K.H.; HONG, S.T. Clinical features and course of ocular toxocariasis in adults. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. San Francisco. v. 4, n. 3, p. 134-141, 2014.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C. Toxocariasis in waste pickers: a case control seroprevalence study. *PloS One*. San Francisco. v. 8, n. 1, 10.1371/journal.pone.0054897, 2013.
- AZIRA, N.M.; ZEEHAIDA, M.; A case report of ocular toxocariasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Haikou. v. 1, n. 2, p.164-165, 2011.
- BELLANGER, A.P.; BAMOULID, J.; MILLON, L.; CHALOPIN, J.M.; HUMBERT, P. Rheumatoid purpura associated with toxocariasis. *Canadian Family Physician Médecin de Famille Canadien*. Williwodale. v.57, n. 12, p. 1413-1414, 2011.
- CALDERA, F.; BURLONE, M. E.; GENCHI, C.; PIRISI, M.; BARTOLI, E. *Toxocara* encephalitis presenting with autonomous nervous system involvement. *Infection*. Berlin, v. 41, n. 3, p. 691-694, 2012.
- CASSENOTE, A.J.; LIMA, A.R.; PINTO NETO, J.M.; RUBINSKY-ELEFANT, G. Seroprevalence and modifiable risk factors for *Toxocara* spp.in Brazilian schoolchildren. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. San Francisco. v. 8, n. 5, doi: 10.1371/journal.pntd.0002830, 2014.
- CERRUTO, M.A.; D'ELIA, C.; ARTIBANI, W. A case of eosinophilic cystitis in patients with abdominal pain, dysuria, genital skin hyperemia and slighttoxocariasis. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*. Milano. v. 85, n. 2, p. 99-100, 2013.
- CHOI, D.; LIM, J.H.; CHOI, D.C.; LEE, K.S.; PAIK, S.W.; KIM, S.H.; CHOI, Y.H.; HUH, S. Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: a cross-sectional study in healthy adults. *The Korean Journal of Parasitology*. Seoul. v.50, n. 1, p.23-27, 2012.
- CHOI, J.H.; CHO, J.W.; LEE, J.H.; LEE, S.W.; KIM, H.J.; CHOI, K.D. Obstructive hydrocephalus due to CNS toxocariasis. *Journal of the Neurological Sciences*. Amsterdam. v. 329, n. 1-2, p. 59-61, 2013.
- COSKUN, F.; AKINCI, E. Hepatic toxocariasis: a rare cause of right upper abdominal pain in the emergency department. *Acta Parasitologica Turcica*. İzmir. v. 37, n. 2, p. 151-153, 2013.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clinical Microbiology Review*. Washington, v. 16, n. 2, p. 265-272, 2003.

DE SOUZA AGUIAR, P.; FURTADO, R. D.; DE AVILA, L. F.; DE LIMA TELMO, P., MARTINS, L. H.; BERNE, M. E.; DA SILVA, P. E.; SCAINI, C. J. Transmammary infection in BALB/c mice with chronic toxocariasis. *Parasitology International*, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 145-147, 2014.

DURANT, J-F.; IRENGE, L.M.; FOGT.-WYRWAS, R.; DUMONT, C.; DOUCET, J-P.; MIGNON, B.; LOSSON, B.; GALA, J-C. Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. *Parasites and vectors*, London, v. 5, e. 288, 2012. doi: 10.1186/1756-3305-5-288, 2012.

FAHRION, A.S.; SCHNYDER, M.; WICHERT, B.; DEPLAZES, P. *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: Is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance? *Veterinary Parasitology*. Amsterdam, v. 177, n. 1-2, p. 186-189, 2011.

FAN, C. K.; SU, K. E. Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitology International*. Amsterdam, v. 53, n. 3, p. 263-271, 2004.

FOGT-WYRWAS, R.; JAROSZ, W.; MIZGAJSKA-WIKTOR, H. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. *Journal of Helminthology*. London, v. 81, n. 1, p. 75-78, 2007.

GUILHERME, E.V.; MARCHIORO, A.A.; ARAUJO, S.M.; FALAVIGNA, D.L.; ADAMI, C.; FALAVIGNA-GUILHERME, G.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L.; Toxocariasis in children attending a Public Health Service Pneumology Unit in Paraná State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. São Paulo. v. 55, n. 3, doi: 10.1590/S0036-46652013000300009, 2013.

GUNERATNE, R.; MENDIS, D.; BANDARA, T.; FERNANDO, S. D. *Toxoplasma*, *Toxocara* and tuberculosis co-infection in a four year old child. *BioMed Central Pediatrics*. London.v. 11, p.44, 2011.

JANG, I.Y.; YANG, Y.J.; CHO, H.J.; CHOI, Y.; SHIN, E.H.; KANG, D.U.; KIM, T.B. Eosinophilic organ infiltration without eosinophilia or direct parasite infection. *Korean Journal of Internal Medicine*. Seoul. v. 29, n. 1, p. 126- 129, 2014.

JIN, Z.; AKAO, N.; OHTA, N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitology International*. Amsterdam, v. 57, n. 4, p. 495-498, 2008.

KANG, E.J.; CHOI, Y.J.; KIM, J.S.; LEE, B.H.; KANG, K.W.; KIM, H.J.; YU, E.S.; KIM, Y.H. Bladder and liver involvement of visceral larva migrans may mimic malignancy. *Cancer Research and Treatment*. Seoul. v. 46, n. 4, p.419-424, 2014.

KANG, H.M.; LEE, C.S.; Diffuse Unilateral Subacute Neuroretinitis in a Healthy Korean Male: The First Case Report in Korea. *Journal of Korean Medical Science*. Seoul.v. 30, n. 3, p. 346-349, 2015.

KHADEMVATAN, S.; RAHIM, F.; TAVALLA, M.; ABDIZADEH, R.; HASHEMITABAR, M.; PCR-based molecular characterization of *Toxocara* spp. using feces of stray cats: A study from Southwest Iran. *Plos One*. San Francisco, v. 8, n. 6, e. 65293, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0065293.

KHADEMVATAN, S.; ABDIZADEH, R.; TAVALLA, M. Molecular characterization of *Toxocara* spp. from soil of public areas in Ahvaz southwestern Iran. *Acta Tropical*. Basel, v. 135, p. 50-54. 2014.

KIM, M.H.; JUNG, J.W.; KWON, J.W.; KIM, T.W.; KIM, S. H.; CHO, S.H.; MIN, K.U.; KIM, Y.Y.; CHANG, Y.S. A case of recurrent toxocariasis presenting with urticarial. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. Seoul. v. 2, n. 4, p. 267-270. 2010.

KIM, J.H.; CHUNG, W.B.; CHANG, K.Y.; KO, S.Y.; PARK, M.H.; SA, Y.K.; CHOI, Y.S.; PARK, C.S., LEE, M.Y. Eosinophilic myocarditis associated with visceral larva migrans caused by *Toxocara canis* infection. *Journal of Cardiovascular Ultrasound*. Seoul. v. 20, n. 3, p. 150-153, 2012.

LEMAIRE, A.; TROUILLIER, S.; SAMOU, F.; DELEVAUX, I.; AUMAITRE, O. Visceral larva migrans with cardiac manifestation: a case report and literature review. *Revue de Médecine Interne*. Paris. v. 35, n. 12, p. 831 – 837, 2014.

LIM, J. H. Hepatic visceral larva migrans of *Toxocara canis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Baltimore.v. 82, n. 4, p.520-521. 2010.

MAFFRAND, R.; AVILA-VÁZQUEZ, M.; PRINCICH, D.; ALASIA, P. Toxocariasis ocular congénita en un recién nacido prematuro. *Anais de Pediatria*. Barcelona, v. 64, n. 6, p. 595-604, 2006.

MAGNAVAL, J. F.; GLICKMAN, L. T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. *Korean Journal of Parasitology*, Seoul, v. 39, n. 1, p. 1-11, 2001.

NOH, Y.; HONG, S. T.; YUN, J.Y.; PARK, H.K.; OH, J.H.; KIM, Y.E.; JEON, B.S. Meningitis by *Toxocara canis* after ingestion of raw ostrich liver. *Journal of Korean Medical Science*. Seoul. v. 27, n. 9, p. 1105 – 1108, 2012.

PARK, H.J.; YOU, G.I.; CHO, K.I.; YANG, J.W.; KIM, S.Y.; KIM, H.S.; CHA, T.J. Cardiac involvement in hypereosinophilia associated with toxocariasis. *Journal of Cardiovascular Ultrasound*. Seoul. v. 22, n. 4, p. 224-227, 2014.

PARK, E.J.; SONG, J.Y.; CHOI, M.J.; JEON, J.H.; CHOI, J.Y.; YANG, T.U.; HONG, K.W.; NOH, J.Y.; CHEONG, H.J.; KIM, W.J. Pulmonary toxocariasis mimicking invasive aspergillosis in a patient with ulcerative colitis. *Korean Journal of Parasitology*. Seoul. v. 52, n. 4, p. 425-428, 2014.

PINELLI, E.; ROELFSEMA, J. H.; BRANDES, S.; KORTBEEK, T. Detection and identification of *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real-time PCR. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam, v. 193, n. 4, p. 337-341, 2013.

PIVETTI-PEZZI. Ocular toxocariasis. *International Journal of Medical Sciences*. Austrália. v. 51, n. 5, p. 563 – 567, 2009.

QUATTROCCHI, G.; NICOLETTI, A.; MARIN, B.; BRUNO, E.; DRUET-CABANAC, M.; PREUX, P.M. Toxocariasis and epilepsy: systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. San Francisco. v. 6, n. 8, e1775. 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001775.

RAMACHANDRAN, J.; CHANDRAMOHAN, A.; GANGADHARAN, S.K.; UNNIKRISHNAN, L.S.; PRIVAMBADA, L.; SIMON, A. Visceral larva migrans presenting as multiple liver abscesses. *Tropical Doctor*. London. v. 43 n. 4, p. 154-157, 2013.

REITEROVÁ, K.; TOMASOVICOVÁ, O.; DUBINSKÝ, P. Influence of maternal infection on offspring immune response in murine larval toxocariasis. *Parasite Immunology*. London, v. 25, n. 7, p. 361-368, 2003.

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the United States Army Medical Department*. Fort Sam Houston, v. 8, n. 4, p. 326, 1948.

RANASURIYA, G.; MIAN, A.; BOUJAOUDE, Z.; TSIGRELIS, C. Pulmonary Toxocariasis: a case report and literature review. *Infection*. Munique. v. 42, n. 3, p.575-578, 2014.

RUBINSKY-ELEFANT, G.; HIRATA, C. E.; YAMAMOTO, J. H.; FERREIRA, M. U. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. London, v. 104, n. 1, p. 3-23, 2010.

SANTARÉM, V. A.; EXPOSTO, C. F. S.; RAMIRES, L. M.; BIN, L. L. C.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; LAPOSY, C. B.; NOGUEIRA, R. M. B. Detection of larvae of *Toxocara canis* in milk: an experimental study in rabbits. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina, v. 35, n. 1, p. 357-364, 2014.

SANTARÉM, V. A.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, M. U. Soil-transmitted helminthic zoonoses in humans and associated risk factors. In: Pascucci, S. (Ed.), Soil Contamination. Rijeka, InTech. p. 43-66. 2011. Available: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/soil-transmitted-helminthic-zoonoses-in-humans-and-associated-risk-factors>. (Access: 15 January 2015).

TELMO P DE L, AVILA LF, SANTOS CA, AGUIAR P DE S, MARTINS LH, BERNE ME, SCAINI CJ. Elevated trans-mammary transmission of *Toxocara canis* larvae in Balb/c mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. São Paulo, v. 57, n. 1, p. 85-87, 2015.

VAN DE, N.; TRUNG, N.V.; LE DUYET, V.; CHAI, J. Y. Molecular diagnosis of an ocular toxocariasis patient in Vietnam. *Korean Journal of Parasitology*. Seoul, v. 51, n. 5, p. 563-567, 2013.

ZIBAEI, M.; FIROOZEH, F.; P. BAHRAMI, SADJADI, S.M. Investigation of anti-*Toxocara* antibodies in epileptic patients and comparison of two methods: ELISA and Western blotting. *Epilepsy research and treatment*. New York. doi: 10.1155/2013/156815, 2013.

Tabela 1 – Percentual e número médio de larvas de *Toxocara canis* recuperadas em amostras de leite (1,0 mL) dos tipos desnatado e integral contaminadas com 50 larvas (15 repetições), com o emprego de uma técnica de centrífugo-sedimentação usando formalina-éter.

Recuperação das larvas			
Tipo de Leite	Percentual médio \pm dp (variação)	Número médio \pm dp (variação)	Valor de p
Desnatado	81,2 \pm 8,7 (70-96)	40,6 \pm 4,4 (35-48)	0,0031
Integral	70,0 \pm 10,2 (50-84)	35,0 \pm 5,1 (25-42)	

- dp= desvio-padrão

Elaboração: autores.

Tabela 2 – Percentual e número médio de larvas de *Toxocara canis* recuperadas em amostras de leite integral (1,0 mL) contaminadas com 50 larvas (15 repetições), com o emprego de uma técnica de centrífugo-sedimentação, para comparação do uso das soluções de formalina 10%, éter etílico 70% e combinação de ambas.

Recuperação das larvas			
Soluções	Percentual médio (variação)	Número médio (variação)	Valor de p
Formalina	67,6 (52-80)	33,8 (26-40)	0,5681
Leite puro	70,0 (50-84)	35,0 (25-42)	
Éter	71,9 (50-88)	35,9 (25-44)	
Formalina-éter	73,1 (52-92)	36,5 (26-46)	

Elaboração: autores.

Tabela 3 – Percentual e número médios de larvas de *Toxocara canis* recuperadas em amostras de leite integral (1,0 mL) contaminadas com 50, 25, 10, 5 e 1 larva (15 repetições), com o emprego de uma técnica de centrífugo-sedimentação, para avaliação do limite de detecção de larvas.

Alíquotas (larvas)	Alíquotas positivas/repetições (%)	Percentual médio de larvas (variação)	Número médio de larvas (variação)
50	15/15 (100)	73,0 (52-92)	36,5 (26-46)
25	15/15 (100)	65,0 (48-84)	16,2 (12-21)
10	15/15 (100)	63,3 (50-90)	6,33 (5-9)
5	15/15 (100)	62,7 (20-100)	3,1 (1-5)
1	10/15 (66,7)	66,7 (0-100)	0,7 (0-1)

Elaboração: autores.

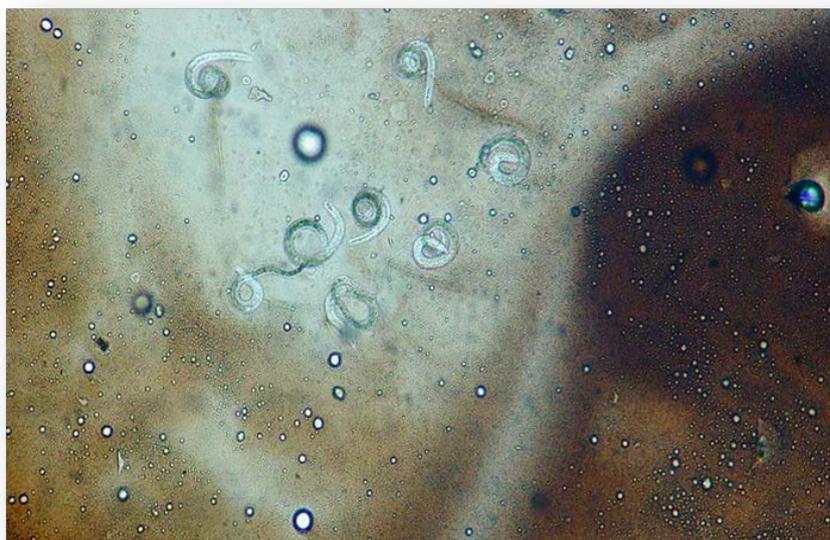
ANEXOS

ANEXO 1

ICROFOTOGRAFIA DE LARVAS DE *TOXOCARA CANIS* RECUPERADAS (SETA) EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO DESNATADO (A) E INTEGRAL (B) ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS. NA FIGURA B, PODE-SE OBSERVAR A PRESENÇA DE GOTÍCULAS DE GORDURA PROVENIENTE DO LEITE



A.



B.

ANEXO 2

TÉCNICA UTILIZADA PARA RECUPERAÇÃO DE LARVAS DE *TOXOCARA CANIS* EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS

Fase 1 - Incubação dos ovos

- Lavagem de fêmeas adultas de *T. canis* em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos, e depois lavagem em solução fisiológica;
- Histerectomia das fêmeas adultas para extração dos ovos;
- Transferência dos ovos para tubo Falco 50 mL;
- Adição de solução de ácido sulfúrico 0,1N (proporção 1:10);
- Manutenção em estufa incubadora (27°C);
- Homogeneização do material a cada dois dias;
- Manutenção mínima de 28 dias;
- Avaliação da embriogênese e de ovos larvados em microscopia óptica (10X).

Fase 2 - Tratamento dos ovos para recuperação de larvas

- Transferência de alíquota de ovos larvados para tubo cônico de centrífuga;
- Centrifugação de material por 5 minutos a 3000 rpm, para retirada do ácido sulfúrico;
- Descarte do sobrenadante e adição de 5,0 mL de água destilada;
- Centrifugação de material por 5 minutos a 3000 rpm, para retirada do ácido sulfúrico;
- Descarte do sobrenadante e transferência de sedimento para placa de Petri;
- Adição de 5,0 mL de hipoclorito de sódio 5%, e lavagem do material (3 minutos);
- Após lavagem, Transferência do material para um tubo cônico e centrifugação por 5 minutos, 3000rpm;
- Após cinco minutos, lavagem do material com água destilada, e nova centrifugação;
- Descarte do sobrenadante, e nova centrifugação com água destilada;
- Avaliação sob microscopia da estrutura da membrana dos ovos;
- Banho-maria por 10 minutos (37°C); acréscimo de pérolas de vidro (seis) no tubo;
- Agitação dos tubos (vórtex) durante 15 minutos;

- Banho-maria por 10 minutos;
- Avaliação da estrutura dos ovos em microscopia óptica (10X).

ANEXO 2 (Continuação)- Técnica utilizada para recuperação de larvas de *Toxocara canis* em amostras de leite bovino artificialmente contaminadas.

Fase 3 - Técnica de Baermann, modificada (recuperação de larvas para contaminação do leite).

- Após avaliação da fragilização da membrana dos ovos, submeter o material a técnica de Baermann modificada;
- Adição de água morna;
- Manutenção em repouso por 12-24 horas;
- Após 24 horas retirar, recuperar as larvas em tubo cônico de centrífuga;
- Manutenção dos tubos em repouso, sob refrigeração;

Fase 4 - Técnica de recuperação de larvas de *Toxocara canis* no leite contaminado

- Colocar 1,0mL de leite bovino em tubo cônico de centrífuga graduado;
- Transferência da amostra contendo larvas (em 100 µL de água destilada);
- Adição de 100µL de água destilada no Eppendorf para o tubo cônico de centrífuga graduado;
- Adição de 100µL de solução formalina 10,0%;
- Homogeneização da amostra;
- Repouso do material (3 minutos);
- Adição de 100µL de éter etílico;
- Repouso do material (2 minutos);
- Homogeneização da amostra;
- Centrifugação a 3000 rpm (1428 xg) durante 5 minutos;
- Avaliação de cinco alíquotas de 50 µL do sedimento, para contagem das larvas;
- Leituras sob microscopia óptica (10x);
- Após leituras: homogeneização da amostra;
- Centrifugação a 3000 rpm (1428xg) durante 5 minutos;

- Avaliação de cinco alíquotas de 50 μ L do sedimento, para contagem das larvas;
- Leitura sob microscopia ótica (10x).