

**“PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA RECUPERAÇÃO DE OVOS  
DE *Toxocara canis* EM SOLO”**

**LUCIANA PUGA MAGOTI**

PRESIDENTE PRUDENTE – SP

2008

**“PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA RECUPERAÇÃO DE OVOS  
DE *Toxocara canis* EM SOLO”.**

**LUCIANA PUGA MAGOTI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém.

616.079 87 Magoti, Luciana Puga  
M211p Padronização de técnica para recuperação de  
ovos de *Toxocara canis* em solo / Luciana Puga  
Magoti. – Presidente Prudente: [s.n.], 2008.  
38 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste:  
Presidente Prudente – SP, 2008.  
Bibliografia

1. *Toxocara* spp. 2. Diagnóstico. I. Título.

**LUCIANA PUGA MAGOTI**

**“PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA RECUPERAÇÃO DE OVOS  
DE *Toxocara canis* EM SOLO”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 29 de agosto de 2008.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém  
Curso de Mestrado em Ciência Animal  
Universidade do Oeste Paulista

---

Profa. Dra. Lúcia Helena O’Dwyer  
Instituto de Biociências  
Universidade Estadual Paulista - Botucatu

---

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira  
Curso de Mestrado em Ciência Animal  
Universidade do Oeste Paulista

*Dedico este trabalho ao meu marido Osmar  
que sempre me apoiou e esteve ao meu lado  
e a minha filha Isabela,  
pela compreensão dos dias que não pude estar com ela.*

*Ao meu orientador Vamilton Santarém  
pela perseverança,  
e por acreditar em mim  
mesmo quando achava que não era possível...*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém, por me aceitar como orientada por sua paciência, dedicação, compreensão, por ter me ajudado a superação de vários limites e inseguranças;

A meu marido Osmar pelas muitas vezes que o deixei para fazer minhas pesquisas e realizar este trabalho, e sempre foi compreensivo e carinhoso.

À minha filha Isabela, pelos dias que passou sozinha para que eu pudesse realizar este trabalho. Você é minha vida!!!

A meus pais, que cumpriram com todos os deveres que a vida lhes poderia impor.

À minha amiga Norma Barbato, que serviu de espelho, pois muitas vezes pensei em desistir, e ela sempre me ajudou a dar mais um passo para poder chegar até o final.

Aos professores colegas de trabalho; pela ajuda nas pesquisas e divisão de tarefas, que possibilitou frequentar o curso.

A Tathiana Dias Sichieri por ter compartilhado a análise experimental e processamento das amostras do solo para o resultado final dos resultados desta pesquisa;

A todos os professores do curso de Mestrado em Ciência Animal, pela dedicação e carinho com que fazem seu trabalho. Parabéns, vocês são demais.

Às professoras doutoras Rosa Maria Barilli Nogueira e Cecília Braga Laposy, componentes da banca examinadora da minha qualificação, pelo enriquecimento que me proporcionaram, pelos elogios que me confortaram;

Ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva II - Hospital Veterinário da Unoeste - Presidente Prudente, local onde foram processadas as amostras.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo incentivo com a Bolsa de Iniciação Científica concedida a Tathiana Dias Sichieri;

Aos funcionários administrativos competentes da Unoeste, pelas diversas vezes que precisei e fui muito bem atendida;

A todas as pessoas, não menos importantes, que passaram por minha vida deixando um pouco de si e levando um pouco de mim.

*“O que provém da boca o Universo manifestará”.*

*(Provérbio Popular)*



## RESUMO

### PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA RECUPERAÇÃO DE OVOS DE *Toxocara canis* EM SOLO

O objetivo do estudo foi padronizar uma técnica para recuperação de ovos de ascarídeos (*Toxocara canis*) em solo, com a comparação de diferentes etapas. Amostras de solo foram previamente esterilizadas e divididas em alíquotas de um grama, sendo contaminadas com 200 ovos. Após a contaminação, foram comparadas, em etapas seriadas, as variáveis: filtragem, tipo de lavagem e re-suspensão do material. Como ponto de partida para comparação, utilizou-se uma técnica com lavagem de solo em Tween 80 (0,2%) e solução de hidróxido de sódio 0,1N; re-suspensão; e centrífugo-flutuação em solução de nitrato de sódio (d=1.20). Os ovos recuperados foram contados com 10 repetições, com três leituras para cada repetição. A filtragem reduziu significativamente a recuperação de ovos em relação ao material não filtrado ( $p < 0,001$ ), enquanto o número de ovos foi significativamente maior quando utilizada a re-suspensão do material ( $p < 0,05$ ). Após padronização, comparou-se as soluções de cloreto de sódio, dicromato de sódio, nitrato de sódio, sulfato de zinco, sulfato de magnésio, havendo diferença entre sulfato de zinco e cloreto de sódio ( $p < 0,001$ ). Dessa forma, as chances de recuperação de ovos de *T. canis* podem ser ampliadas pelo re-suspensão do sedimento, enquanto que a filtragem reduz consideravelmente o número de ovos.

Palavras-chave: *Toxocara* spp, ovo, diagnóstico, contaminação ambiental.

## ABSTRACT

### PADRONIZATION OF TECHNIQUE FOR RECOVERY OF *Toxocara canis* IN SOIL

The purpose of this study was to standardize a flotation technique for the recovery of *Toxocara canis* eggs from soil, comparing different steps. The tests were done under standardized conditions on 1 g of previously sterilized soil samples contaminated experimentally with 200 eggs of *T. canis*. The following variables were evaluated in serial steps: sieving; type of wash; time of stirring; resuspension of sediment; solution flotation. Centrifuge-flotation in sodium nitrate (d= 1,20) was adopted as an initial technique, using Tween 80 (0.2%) and decinormal sodium hydroxide as solutions for washing the samples. Ten tests were made to compare the variables, using counting in triplicate. The sieving of the material reduced the recovery of eggs in a significant difference ( $p<0.001$ ) and the number of eggs recovered were higher when the sediment was resuspended ( $p<0.05$ ). After standardization, flotation solutions sodium chloride, zinc sulphate, sodium dichromate, magnesium sulphate, and sodium nitrate (d= 1,20) were compared. There was a significant difference between zinc sulphate and sodium chloride ( $p<0.05$ ). In conclusion, the chance of recovering *T. canis* eggs from samples using flotation solutions can be increased by using resuspended sediment. On the other hand, the sieving procedure can drastically reduce the number of eggs.

Key Words: *Toxocara* spp, egg, diagnosis, environmental contamination.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
2 ARTIGO CIENTÍFICO: Padronização de técnica para recuperação de ovos de <i>Toxocara canis</i> em solo.....	23

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A toxocaríase é uma enfermidade ocasionada pela ingestão de ovos embrionados de *Toxocara canis* ou, menos comumente, de *T. cati* parasitas de cães e gatos (ACHA; SZYFRES, 1986). Nos seres humanos ao eclodir, as larvas atravessam a parede do intestino delgado e ganham a circulação pela via hepática, como não conseguem completar seu ciclo, migram para diversos órgãos, causando a síndrome de larva *migrans* visceral (BEAVER et al., 1952), ou olhos, dando origem à síndrome de larva *migrans* ocular (ZINKHAM, 1978), que são conhecidas atualmente como toxocaríase visceral e ocular, respectivamente (MAGNAVAL et al., 2001).

A enfermidade tem sido apontada como importante zoonose em países desenvolvidos e em desenvolvimento (SCHANTZ, 1989). Magnaval et al. (2001) consideram-na como a mais prevalente helmintíase em países industrializados. Apesar de sua importância, a toxocaríase é pouco reconhecida como um problema de saúde pública (ALTCHEH et al., 2003), mas sua frequência tem sido subestimada especialmente em locais que favorecem o desenvolvimento de *Toxocara* spp. (ALDERETE et al., 2003).

As manifestações clínicas da toxocaríase no homem são bastante variadas e dependem de vários fatores, como resposta imune do hospedeiro, dose infectante, padrão de migração e distribuição das larvas nos diferentes tecidos (SCHANTZ, 1989).

A toxocaríase visceral pode ocasionar problemas respiratórios como asma e pneumonia (ALDERETE et al., 2003; FERREIRA et al., 2007) e alterações neurológicas como meningoencefalite (VIDAL et al., 2003), convulsões (MOREIRA-SILVA et al., 2004) e epilepsia (BÄCHLI et al., 2004). Outros autores descrevem hepatopatias (ALTCHEH et al., 2003; HOSSACK et al., 2008), miocardite (ABE et al., 2002), urticária (ALTCHEH et al., 2003), pancreatite (D'ONOFRIO et al., 2006). São também relatados casos de eosinofilia decorrente da infecção por *Toxocara* spp. associados a mielite (GOFFETTE et al., 2000), pneumonia (INOUE et al., 2002), meningoencefalite (VIDAL et al., 2003), efusão pleural (ASHWATH et al., 2004), ascite (CHIRA et al., 2005) e eosinofilia idiopática (AFSHARA et al., 2007).

No caso da forma oftálmica são descritos casos de endoftalmite (ESPINOZA et al., 2003; MORI et al., 2007), estrabismo e uveíte em crianças (AZAR et al., 2004).

A principal via de transmissão da toxocaríase humana se dá pela ingestão de ovos larvados presentes em solo, especialmente de parques e jardins (SCHANTZ, 1989). A doença é mais comum em crianças, que tem maior contato com solo contaminado, além dos hábitos de geofagia e onicofagia, que facilitam a ingestão de ovos de *Toxocara* spp (GLICKMAN; SCHANTZ, 1981; FAN et al., 2004; CHIODO et al., 2006).

No Brasil, a freqüência de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em crianças vem sendo estudada. Em inquéritos seroepidemiológicos no Estado de São Paulo, a prevalência variou de 3,6% (CHIEFFI, 1984) a 24,7% (CASEIRO, 1996) em crianças e adolescentes de vários municípios. Na cidade de São Paulo, Alderete et al. (2003) verificou 38,8% de soroprevalência em crianças de 14 escolas públicas.

A contaminação ambiental pode ser facilitada uma vez que as fêmeas adultas de *Toxocara* spp são capazes de produzir até 200.000 ovos diariamente, que são eliminados juntamente com as fezes dos animais. No ambiente os ovos se tornam infectantes em duas a cinco semanas, sob condições ambientais adequadas de temperatura e umidade, podendo permanecer viáveis por meses ou anos (SCHANTZ, 1989).

Outro fator que contribui para a infecção humana a toxocaríase é que a população utiliza as áreas públicas como locais de passeio para seus animais de estimação e consideravam esses ambientes como os mais apropriados para defecação dos animais, como observado em Tenerife, Espanha (TOLEDO SECO et al., 1994).

Diversos estudos têm registrado a contaminação de áreas de lazer nos mais diversos estados do Brasil (Quadro 1).

QUADRO 1 – Freqüência de contaminação, por ovos de *Toxocara* spp, de áreas públicas de lazer no Brasil, segundo diferentes autores

Autores	Local	Número de Amostras Examinadas	Freqüência (%)
Chieffi e Muller (1976)	Londrina-Pr	15 praças	60,0
Ferreira et al. (1976)	Rio de Janeiro - RJ	-	41,6
Alcântara et al. (1989)	Salvador-Ba	298 amostras	24,8
Costa-Cruz et al. (1994)	Uberlândia - MG	39 praças	23,07
Corrêa et al. (1995)	Santa Maria-RS	24 praças	91,7
Santarém et al. (1998)	Botucatu - SP	10 praças	17,5
Coelho et al. (2001)	Sorocaba - SP	30 praças	53,3
Alves et al. (2004)	Lavras-MG	23 praças	17,4
Capuano e Rocha (2005)	Ribeirão Preto-SP	78 praças	20,5
Muradian et al. (2005)	São Paulo-SP	37 amostras	29,7

Vários fatores podem estar envolvidos na contaminação do solo, como a textura do solo (NUNES et al., 1994), as condições climáticas e ambientais, e a presença de cães e de gatos (MURADIAN et al., 2005). Além desses fatores, existe uma variabilidade muito grande nas metodologias empregadas para recuperação dos ovos de *Toxocara* spp, que pode levar a resultados falso-negativos e, conseqüentemente, uma subestimação da freqüência da contaminação do solo (COELHO et al., 2001). Segundo os autores, os métodos empregados nesse tipo de pesquisa são extremamente variáveis, impedindo uma comparação confiável entre os estudos.

Dessa forma, diversos autores têm se preocupado em desenvolver uma técnica para aumentar a sensibilidade e definir a espécie de *Toxocara* envolvida na contaminação (BORECKA; GAWOR, 2008).

Entretanto, até o momento, os estudos sobre pesquisa de ovos em solo foram realizados principalmente com técnicas de centrífugo-flutuação, que vêm sendo amplamente utilizadas no Brasil e em outros países (Quadros 2 e 3).

O Quadro 2 apresenta algumas dessas diferenças em trabalhos realizados para pesquisa de ovos de *Toxocara* spp. em solo, no Brasil.

QUADRO 2 – Variáveis presentes nas técnicas para recuperação de ovos de *Toxocara* spp em solo, empregadas por diversos autores, no Brasil, incluindo o tipo de lavagem, a solução de flutuação e sua densidade, a realização de re-suspensão de sedimento e o número de lâminas observadas

Autor(es)/Ano	Tipo de Lavagem	Solução Flutuação	Densidade da solução	Re-suspensão	Lâmina
Ferreira et al. (1976)	Hidróxido de sódio 2,13%	Nitrato de sódio	1.38	Sim	-
Santarém et al. (1998)	Hidróxido de sódio 0,1N	Dicromato de sódio	1.35	Sim	3
Nunes et al. (2000)	Água	Dicromato de sódio	1.35	Sim	2
Coelho et al. (2001)	Não	Sulfato de Magnésio e Iodeto de Potássio 5%	-	Não	6
Capuano e Rocha (2005)	Tween 80 1%	Sulfato de Magnésio +Iodeto de Potássio 5% e Sulfato de Zinco	1.33	Sim	1
Queiroz et al. (2006)	Anti-formina 30%	Dicromato de sódio	1.40	Não	3

Da mesma forma, o Quadro 3 apresenta algumas dessas diferenças em trabalhos realizados para pesquisa de ovos de *Toxocara* spp em solo, em diferentes países.

QUADRO 3 – Variáveis presentes nas técnicas para recuperação de ovos de *Toxocara* spp em solo, empregadas por diversos autores, em outros países, incluindo o tipo de lavagem, a solução de flutuação e sua densidade, a realização de re-suspensão de sedimento e o número de lâminas observadas

Autor(es)/Ano	Tipo de Lavagem	Solução Flutuação	Densidade da solução	Re-suspensão	Lâmina
Dubin et al. (1975)	Tween 60	Nitrato de Sódio	-	Não	1
Read e Thompson (1976)	-	Sulfato de zinco	-	-	-
Dunsmore et al. (1984)	Tween 80	Nitrato de sódio	-	Sim	2
Childs (1985)	Tween 60 0,0025%	Sulfato de zinco	-	Não	2
Shimizu (1993)	-	Nitrato de sódio	1.39	Sim	-
Tsuji et al. (1996)	Água destilada	Sulfato de zinco	1.20	Sim	1
Fonrouge et al. (2000)	Tween 80 0,2%	Açúcar	1.26	Não	1

A discrepância entre as técnicas está fundamentada principalmente na(s) solução(ões) empregada(s) para lavagem(ns), solução empregada para flutuação e sua densidade, tempo de espera entre a lavagem a flutuação e número de leituras.



Na tentativa de avaliar qual técnica empregada para recuperação de ovos de *Toxocara* spp. em solo apresentava os melhores resultados, Dada e Lindquist (1979), Quinn et al. (1980), Kazakos (1983), e Oge e Oge (2000) realizaram estudos comparativos.

Dada e Lindquist (1979), Quinn et al. (1980), Kazakos (1983) verificaram que não existe diferença entre a utilização de hidróxido de sódio e água destilada para lavagem do solo.

Uma das conclusões de Kazakos (1983), por sua vez, foi a de que a utilização do detergente aniônico, no caso o Tween, aumentou significativamente a recuperação dos ovos.

Oge e Oge (2000) observaram que a solução de Nitrato de Sódio é superior às de Cloreto de Sódio, Sulfato de Magnésio e Sulfato de Zinco na densidade de 1.22.

Contudo, ao analisar os trabalhos em conjunto, há diferenças entre os seus resultados, dificultando a definição de uma técnica. Essa variação entre as metodologias deve-se ao fato de os mesmos compararem as técnicas como um todo sem se preocuparem com as possíveis interferências das variáveis. Uma das mais importantes foi a diversidade de densidades das soluções de flutuação utilizadas para comparação das técnicas.

Dessa forma, diante do que foi exposto, o objetivo da presente pesquisa foi a padronização de técnica de recuperação de ovos de ascarídeos (*T. canis*), comparando etapas dentro de uma técnica pré-estabelecida, avaliando a interferência de diferentes variáveis e soluções, em solo artificialmente contaminado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ABE, K. et al. Myocarditis associated with visceral larva migrans due to *Toxocara canis*. **International Medicine**, v. 41, p. 706-708, 2002.

ACHA, P.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles al hombre y a los animales**. 2.ed. Washington: Organización Mundial de la Salud, 1986.

AFSHARA, K.; VUCINICB, V.; SHARMAA, O. P. Eosinophil cell: pray tell us what you do!. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 13, p. 414–421, 2007.

ALCÂNTARA, N. et al. Environmental contamination by *Toxocara* sp eggs in public areas of Salvador, Bahia State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, p. 187-190, 1989.

ALDERETE, J. M. S. et al. Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butantã region, São Paulo, Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 593-597, 2003.

ALTCHEH, J. et al. Toxocariasis: aspectos clínicos y de laboratorio em 54 pacientes. **Annals of Pediatrics**, v. 58, p. 425-431, 2003.

ASHWATH, M. L.; ROBINSON, D. R.; KATNER, H. P. A presumptive case of toxocariasis associated with eosinophilic pleural effusion: case report and literature review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 764, 2004

AZAR, D. M. et al. Pediatric uveitis: a Sydney clinic experience. **Clinical Experimental Ophthalmology**, v. 32, p. 468-471, 2004.

BÄCHLI, H.; MINET, J. C.; GRATZL, O. Cerebral toxocariasis: a possible cause of epileptic seizure in children. **Children Nervous System**, v. 20, p. 468-472, 2004.

BEAVER, P. C. et al. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. **Pediatrics**, v. 9, p. 7-19, 1952.

---

\* Normas ABNT – Unoeste.

BORECKA, A.; GAWOR, J. Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp eggs. **Journal of Helminthology**, v. 82, p. 119–122, 2008.

CAPUANO, D. M.; ROCHA, G. M. Environmental contamination by *Toxocara* sp eggs in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 223-226, 2005.

CASEIRO, M. M. **Síndrome da larva migrans visceral causada por larvas de *Toxocara canis* (Wrener, 1782 e Stiles, 1905), no município de Santos, 1996.** 121 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHIEFFI, P. P.; MULLER, E. E. Prevalência de parasitismo por *Toxocara canis* em cães e presença de ovos de *Toxocara* sp no solo de localidades públicas da zona urbana do município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p. 367-372, 1976.

CHIEFFI, P. P. **Contribuição ao estudo da síndrome da larva migrans visceral por *Toxocara* em cinco município do Estado de São Paulo, Brasil. Inquérito epidemiológico.** 1984. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHILDS, J. E. The prevalence of *Toxocara* species ova in backyards and gardens of Baltimore, Maryland. **American Journal of Public Health**, v. 75, p. 1092-1094, 1985.

CHIODO, P. et al. Related factors to human toxocariasis in a rural community of Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 397-400, 2006.

CHIRA, O. et al. Eosinophilic ascites in a patient with *Toxocara canis* infection. A case report. **Roman Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 397-400, 2005.

COELHO, L. M. P. S. et al. *Toxocara* spp. eggs in public squares of Sorocaba, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 189-191, 2001.

CORRÊA, G. L. B. et al. Contaminação do solo por ovos, larvas de helmintos e oocistos de protozoários, em praças públicas de Santa Maria e sua importância em saúde pública. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, p. 137, 1995.

COSTA-CRUZ, J. M.; NUNES, R. S.; BUSO, A. G. Presença de ovos de *Toxocara* sp em praças públicas da cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, p. 39-42, 1994.

DADA, B. J. O.; LINDQUIST, W. D. Studies on flotation techniques for the recovery of helminth eggs from soil and the prevalence of eggs of *Toxocara* spp in some Kansas public places. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 174, p. 1208-1210, 1979.

D'ONOFRIO, M. et al. Mass-forming pancreatitis: value of contrast-enhanced ultrasonography. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 4181-4184, 2006.

DUBIN, S.; SEGALL, S.; MARTINDALE, J. Contamination of soil in two city parks with canine nematode ova including *Toxocara canis*: a preliminary study. **American Journal of Public Health**, v. 65, p. 1242-1245, 1975.

DUNSMORE, J. D.; THOMPSON, R. C. A.; BATES, I. A. Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 16, p. 303-311, 1984.

ESPINOZA, Y. et al. Toxocariosis humana en pacientes con lesion ocular. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 64, p. 547-551, 2003.

FAN, C. K. et al. Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among mountain aboriginal schoolchildren living in contaminated districts in eastern Taiwan. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, p. 1312-1318, 2004.

FERREIRA, L. F.; OLIVEIRA, E. L.; CAMILO-COURA, L. Sobre a presença de ovos de *Toxocara* em praças da cidade do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, p. 51-54, 1976.

FERREIRA, M. U. et al. Bottle feeding and exposure to *Toxocara* as risk factors for wheezing illness among under-five Amazonian children: a population-based cross-sectional study. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 53, p. 119-124, 2007.

FONROUGE, R. et al. Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* sp. en plazas y parques públicos de la ciudad de La Plata. Buenos Aires, Argentina. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 55, p. 83-85, 2000.

GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiology Review**, v. 3, p. 230-50, 1981.

GOFFETTE, S. et al. Eosinophilia pleocytosis and myelitis relates to *Toxocara canis* infection. **European Journal of Neurology**, v. 7, p. 703-706, 2000.

HOSSACK, J. et al. A case of adult hepatic toxocariasis. **Natural Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, p. 344-348, 2008.

INOUE, K. et al. Chronic eosinophilia pneumonia due to visceral larva migrans. **Internal Medicine**, v. 41, p. 478-482, 2002.

KAZAKOS, K. R. Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 896-900, 1983.

MAGNAVAL, J. et al. Highlights of human toxocariasis. **Korean Journal of Parasitology**, v. 39, p. 1-11, 2001.

MORI, K.; OHTA, K.; MURATA, T. Vasoproliferative tumors of the retina secondary to ocular toxocariasis. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 42, p. 758-759, 2007.

MURADIAN, V. et al. Epidemiological aspects of visceral larva migrans in children living at São Remo community, São Paulo (SP), Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 93-97, 2005.

NUNES, C. M.; SINHORONI, I. L.; AGASSAWARA, S. Influence of soil texture in the recovery of *Toxocara canis* eggs by a flotation method. **Veterinary Parasitology**, v. 53, p. 269-274, 1994.

NUNES, C. M. et al. Ocorrência de larva migrans na areia de áreas de lazer das escolas municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 656-658, 2000.

OGE, H.; OGE, S. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 75-79, 2000.

QUEIROZ, M. L. et al. Frequency of soil contamination by *Toxocara canis* eggs in the south region of São Paulo municipality (SP, Brazil) in a 18-month period. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v 48, p. 317-319, 2006.

QUINN, R.; SMITH, H. V.; GIRDWOOD, R. W. A. Studies on the incidence of *Toxocara* and *Toxascaris* spp. ova in the environmental. 1. A comparison of flotation procedures for recovery of *Toxocara* spp. ova from soil. **Journal of Hygiene**, v. 84, p. 83-89, 1980.

READ, M. A.; THOMPSON, R. C. A. Prevalence of *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina* in dogs faeces deposited on the streets of Leeds. **Journal of Helminthology**, v. 50, p. 95-96, 1976.

SANTARÉM, V. A.; SARTOR, I. F.; BERGAMO, F. M. M. Contaminação, por ovos de *Toxocara* sp, de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 529-532, 1998.

SCHANTZ, P. *Toxocara* larva migrans now. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, p. 21-34, 1989.

SHIMIZU, T. Prevalence of *Toxocara* eggs in sandpits in Tokushima city and its outskirts. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 55, p. 807-811, 1993.

SOULSBY, E. J. L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982.

TOLEDO SECO, C. I. et al. La contaminación parasitaria de parques y jardines como problema de Salud Pública. Datos de la isla de Tenerife. **Revista de Sanidad y Higiene Pública**, v. 68, p. 617-622, 1994.

TSUJI, O. V. et al. Contaminación de suelos por huevos de *Toxocara* sp. em parques públicos y jardines de casas-habitación de la ciudad de México. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 51, p. 54-58, 1996.

VIDAL J. E.; SZTCJNBOK, J.; SEGURO A. C. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. **Journal of Tropical Medicine**, v. 69, p. 341-343, 2003.

ZINKHAM, W. H. A review and reassessment indicating two forms of clinical expression: visceral and ocular. **American Journal of Diseases in Children**, v. 132, p. 627-628, 1978.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### **PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA RECUPERAÇÃO DE OVOS DE *Toxocara canis* EM SOLO**

#### **PADRONIZATION OF TECHNIQUE FOR RECOVERY OF *Toxocara canis* IN SOIL**

**LUCIANA PUGA MAGOTI<sup>1</sup>; TATHIANA DIAS SICHIERI<sup>2</sup>;  
VAMILTON ALVARES SANTARÉM<sup>3</sup>**

#### **ABSTRACT**

The purpose of this study was to standardize a flotation technique for the recovery of *Toxocara canis* eggs from soil, comparing different steps. The tests were done under standardized conditions on 1 g of previously sterilized soil samples contaminated experimentally with 200 eggs of *T. canis*. The following variables were evaluated in serial steps: sieving; type of wash; time of stirring; resuspension of sediment; solution flotation. Centrifuge-flotation in sodium nitrate (d= 1,20) was adopted as an initial technique, using Tween 80 (0.2%) and decinormal sodium hydroxide as solutions for washing the samples. Ten tests were made to compare the variables, using counting in triplicate. The sieving of the material reduced the recovery of eggs in a significant difference (p<0.001) and the number of eggs recovered were higher when the sediment was resuspended (p<0.05). After standardization, flotation solutions sodium chloride, zinc sulphate, sodium dichromate, magnesium sulphate, and sodium nitrate (d= 1,20) were compared. There was a significant difference between zinc sulphate and sodium chloride (p<0.05). In conclusion, the chance of recovering *T. canis* eggs from samples using flotation solutions can be increased by using resuspended sediment. On the other hand, the sieving procedure can drastically reduce the number of eggs.

**KEY WORDS:** *Toxocara* spp, egg, diagnosis, soil.

---

<sup>1</sup> Mestranda no Programa de Ciência Animal - Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste).

<sup>2</sup> Aluna do Curso de Medicina Veterinária da Unoeste.

<sup>3</sup> Mestrado em Ciência Animal - Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste). Rodovia Raposo Tavares, km 572 – Bairro Limoeiro – Presidente Prudente, SP, 190167-175, Brasil. E-mail: vamilton@unoeste.br



## RESUMO

O objetivo do estudo foi padronizar uma técnica para recuperação de ovos de *Toxocara canis* em solo, com a comparação de diferentes etapas. Amostras de solo foram previamente esterilizadas e divididas em alíquotas de um grama, sendo contaminadas com 200 ovos. Após a contaminação, foram comparadas, em etapas seriadas, as variáveis: filtragem, tipo de lavagem e re-suspensão do material. Como ponto de partida para comparação, utilizou-se uma técnica com lavagem de solo em Tween 80 (0,2%) e solução de hidróxido de sódio 0,1N; re-suspensão; e centrifugo-flutuação em solução de nitrato de sódio (d=1.20). Os ovos recuperados foram contados com 10 repetições, com três leituras para cada repetição. Verificou-se que a filtragem reduziu significativamente a recuperação de ovos em relação ao material não filtrado ( $p < 0,001$ ) e que o número de ovos foi significativamente maior quando utilizada a re-suspensão do material ( $p < 0,05$ ). Após padronização, comparou-se as soluções de cloreto de sódio, dicromato de sódio, nitrato de sódio, sulfato de zinco, sulfato de magnésio, havendo diferença entre sulfato de zinco e cloreto de sódio ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença quando as soluções de nitrato de sódio e sulfato de zinco foram utilizadas nas densidades 1.20; 1.25 e 1.30. Dessa forma, as chances de recuperação de ovos de *T. canis* podem ser ampliadas pelo re-suspensão do sedimento, enquanto que a filtragem reduz consideravelmente o número de ovos.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxocara* spp, ovo, diagnóstico, solo.

## INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma enfermidade ocasionada pela ingestão de ovos embrionados de *Toxocara canis* ou, menos comumente, de *T. cati*. Ao eclodir, as larvas atravessam a parede do intestino delgado e ganham a circulação pela via hepática, migrando para diversos órgãos, causando a síndrome de larva *migrans* visceral (BEAVER et al., 1952), ou olhos, dando origem à síndrome de larva *migrans* ocular (ZINKHAM, 1978).

Magnaval et al. (2001) apontam a toxocaríase como a mais importante helmintose dos países industrializados. Nesses países, bem como nos em desenvolvimento, parques e praças públicas são as principais fontes de infecção da população humana, especialmente de crianças com idade entre um e cinco anos, cujos hábitos geofágicos levam-nas a ingerirem ovos embrionados presentes em ambientes contaminados (ACHA; SZYFRES, 1986).

No Brasil, estudos têm registrado a contaminação de áreas de lazer em diversos estados. Em São Paulo, a frequência de contaminação variou de 17,5%, em Botucatu (SANTARÉM et al., 1998), a 53,3%, em Sorocaba (COELHO et al., 2001). Em Londrina, Paraná, foram registradas 60% das praças contaminadas (CHIEFFI; MÜLLER, 1976), enquanto no Rio de Janeiro a frequência foi de 41,6% (FERREIRA et al., 1976). Em Santa Maria, no interior do Rio Grande do Sul, 91,7% das praças estudadas apresentavam a presença de ovos de *Toxocara* spp (CORRÊA et al., 1995).

Apesar de esses trabalhos indicarem a contaminação do solo em locais de recreação pública, Coelho et al. (2001) observaram que os métodos empregados nesse tipo de pesquisa são extremamente variáveis, impedindo uma comparação confiável entre os estudos.

Segundo os dados da literatura, as técnicas de centrífugo-flutuação são as mais amplamente utilizadas para recuperação de ovos de *Toxocara* spp em solo. Contudo, a discrepância entre as técnicas está fundamentada principalmente na(s) solução(ões) empregada(s) para lavagem(ns), solução empregada para flutuação, como sulfato de zinco, nitrato de sódio, dicromato de sódio e sulfato de magnésio. A densidade dessas soluções, o tempo de espera entre a lavagem e a flutuação, o número de leitura das lâminas, bem como o tipo de solo analisado são outros fatores que podem influenciar nos resultados.

Dada e Lindquist (1979), Quinn et al. (1980), Kazakos (1983), e Oge e Oge (2000) compararam diversas técnicas empregadas para recuperação de ovos de *Toxocara* spp em solo. Oge e Oge (2000) verificaram que a solução de Nitrato de Sódio ( $d=1.22$ ) é superior às soluções de Cloreto de Sódio, Sulfato de Magnésio e Sulfato de Zinco quando empregada a mesma densidade. A pesquisa de Dada e Lindquist (1979), Quinn et al. (1980), revelou que não existe diferença entre a utilização de hidróxido de sódio e água destilada para lavagem do solo. Uma das conclusões de Kazakos (1983) foi a de que a utilização do detergente aniônico, no caso o Tween, aumentou significativamente a recuperação dos ovos.

Contudo, ao analisar os trabalhos em conjunto, há diferenças entre os seus resultados, dificultando a definição de uma técnica. Essa discrepância deve-se especialmente às metodologias empregadas pelos pesquisadores, que compararam as técnicas como um todo sem avaliarem as possíveis interferências das variáveis.

Dessa forma, diante do que foi exposto, o objetivo do presente estudo foi padronizar uma técnica recuperação de ovos de ascarídeos (*T. canis*), utilizando-se um estudo seriado, comparando as variáveis presentes na técnica de centrífugo-flutuação, em solo artificialmente contaminado por ovos de *T. canis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Colheita das Amostras e Esterilização do Solo

Amostras de solo arenoso-argiloso foram obtidas do Campus Universitário da Universidade do Oeste Paulista - Unoeste - Presidente Prudente, a uma profundidade de 5,0 a 10,0 cm da superfície, retirando-se toda a sujidade superficial da mesma.

As amostras foram divididas em alíquotas de 50 g e dispostas em placas de Petri. Após a pesagem, as placas foram colocadas em estufa à temperatura de 150<sup>0</sup>C durante 30 minutos, a fim de eliminar os possíveis ovos de nematódeos presentes na amostra, segundo técnica descrita por Quinn et al. (1980).

### Contaminação das Amostras de Solo

Para obtenção dos ovos, fêmeas adultas de *T. canis* foram recuperadas de filhotes oriundos do canil da Unoeste, infectados naturalmente. Após eliminação espontânea dos parasitos, as fêmeas do nematódeo foram acondicionadas em coletores universais de plástico e encaminhadas ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva II (Parasitologia Veterinária) do Hospital Veterinário da mesma Instituição.

Os ovos foram obtidos por dissecação do terço anterior do útero das fêmeas do nematódeo (FAN; SU, 2004), em estereomicroscópio, contados e separados em alíquotas de 200 ovos, seguindo-se de contaminação do solo de acordo com critérios adotados por Nunes et al. (1994), com pequenas modificações. Os ovos foram re-suspensos em 0,5 mL de solução fisiológica e essa alíquota dispersa em um grama do solo previamente esterilizado.

### Técnica de Flutuação

Como ponto de partida para comparação das variáveis, foi utilizada a técnica de Dunsmore et al. (1984) com pequenas modificações, uma vez que a mesma foi considerada como a mais eficiente para recuperação de ovos de *T. canis* em amostras artificialmente contaminadas (OGE; OGE, 2000).

Primeiramente, as alíquotas contaminadas receberam adição de 10 mL de solução de lavagem Tween 80 a 0,2% (v/v). Após homogeneização, cada uma delas foi filtrada em gaze e transferida para um cálice de sedimentação distinto, ficando em repouso da noite para o dia seguinte. Após repouso, o sobrenadante de cada alíquota foi desprezado e adicionados 6,0 mL da mesma solução de pré-lavagem ao sedimento, que era transferido para um tubo cônico de centrífuga graduado para 12,0 mL. O material foi homogeneizado durante 30 minutos em homogeneizador de sangue (HS 22 -PHOENIX) por 25 r.p.m. e centrifugado (Centrífuga Excelsa Baby II 206 BL – FANEM) durante 5 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e recebeu 9,0 mL de solução decinormal de hidróxido de sódio, com re-suspensão do material.

Após dois minutos de homogeneização, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante era então descartado e foram adicionados ao sedimento 11,0 mL de solução de nitrato de sódio ( $d=1.20 \text{ g/cm}^3$ ), que consistiu da etapa de flutuação dos ovos. Após re-suspensão do material, ocorreu mais uma centrifugação com o mesmo padrão descrito anteriormente.

Após esse processo, o tubo foi preenchido com a mesma solução de flutuação até a formação de um menisco. Sobre esse menisco, colocada uma lamínula de vidro de 22X22mm, e o tubo permaneceu em posição vertical por 5 minutos, para a flutuação de ovos, quando a lamínula foi transferida para uma lâmina histológica, que foi observada sob microscopia ótica em objetiva de 10X.

### **Avaliação das Variáveis**

A avaliação das interferências das variáveis sobre o processo de recuperação baseou-se no seguinte organograma:

**Passo 1-** Interferência do tempo de filtragem do material antes do processo de recuperação de ovos:

Filtragem com 12 horas X Filtragem com 2 horas antes do processamento

Melhor do passo 1 segue para passo 2

**Passo 2-** Interferência do tipo de lavagem:

Lavagem com Tween 80 (0,2%) X Lavagem com água destilada

Melhor do passo 2 segue para passo 3

**Passo 3-** Interferência da re-lavagem com solução decinormal de hidróxido de sódio (NaOH 0,1N):

Lavagem com NaOH 0,1N X Lavagem com Água destilada

Melhor do passo 3 segue para passo 4

**Passo 4-** Interferência de uma ou duas lavagens com Água destilada:

Uma lavagem x Duas lavagens

Melhor do passo 4 segue para passo 5

**Passo 5-** Interferência do tempo de homogeneização:

Homogeneização por 2 minutos X Homogeneização por 30 minutos

Melhor do passo 5 segue para passo 6

**Passo 6-** Interferência da re-suspensão

Re-suspensão da amostra X Sem re-suspensão da amostra

Após realização das comparações, estabeleceu-se os procedimentos obtidos nos passos 1 a 6, para comparação das soluções de flutuação (cloreto de sódio, dicromato de sódio, nitrato de sódio, sulfato de magnésio, e sulfato de zinco), com o padrão de densidade (1.20), e avaliar posteriormente as duas melhores soluções em diferentes densidade (1.20; 1.25 e 1.30).

Para cada etapa de comparação foram realizadas dez repetições, com três leituras para cada repetição, sendo a média utilizada para comparação entre as técnicas.

### **Controle**

Uma alíquota de 1,0 g de solo esterilizado foi utilizada como controle em todos os passos de comparação das variáveis, para assegurar a esterilização do solo.

### **Análise Estatística**

Para comparação das médias obtidas com a recuperação de ovos, adotou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. No caso de não ocorrer diferença entre elas, o material mais barato e mais fácil de ser obtido foi escolhido para continuidade do processo de comparação entre as variáveis. A comparação entre as densidades das soluções de flutuação foram submetidas à ANOVA. Adotou-se nível de significância de 5% (TRIOLA, 1999).

## RESULTADOS

No presente estudo, foram comparadas etapas dentro de uma técnica pré-estabelecida para avaliar a interferência de variáveis (filtragem, tempo de repouso do material, tipo de lavagem re-lavagem, tempo de homogeneização e re-suspensão do sedimento) (Tabela 1) e também de diferentes soluções (Tabela 2) e estabelecer a melhor técnica para análise de solo.

No primeiro passo, observou-se que a filtragem interfere de forma negativa na recuperação dos ovos, reduzindo drasticamente o número destes. Quando o material não foi filtrado, a média foi significativamente superior, 25,2 ovos obtidos com  $Zn_2SO_4$  contra a utilização de NaCl ( $p < 0,001$ ) (tabela 2).

Na segunda etapa, avaliou-se o repouso das amostras antes do seu processamento, porém não houve diferença quando esse tempo decorre em 2 horas ou em *overnight* ( $p = 0,6523$ ). Dessa forma, considerou-se que o tempo de 2 horas seria suficiente para o repouso das amostras.

Da mesma forma, não houve diferença ( $p = 0,8764$ ) quando foi empregada a água destilada ou a solução aniônica de Tween 80 (0,2%) para lavagem do solo, e também quando da segunda lavagem com água destilada ou solução decinormal de NaOH ( $p < 0,9453$ ). Contudo, vale ressaltar que durante o tratamento do material com solução de NaOH foi observado o rápido ressecamento do material e rompimento dos ovos, o que pode ter comprometido a recuperação dos mesmos. Dessa forma, como a água destilada é de mais fácil obtenção e mais barata, adotou-se a mesma para o processo de lavagem.

Quando se comparou a lavagem do solo contaminado com água destilada, a repetição do processo duas vezes foi significativamente superior a uma única lavagem ( $p = 0,0039$ ).

As amostras nesse estudo foram homogeneizadas por um período de dois ou 30 minutos antes do processo de recuperação com solução hipertônica. Entretanto, não houve diferença entre esses períodos ( $p = 0,1934$ ).

Adotou-se nesse ensaio a leitura das amostras em sistema de triplicata. Nessa etapa foram comparadas a re-suspensão ou não do sedimento, havendo diferença significativa quando as amostras foram re-suspensas ( $p < 0,0059$ ).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da comparação das soluções hipertônicas.

A recuperação de ovos foi maior quando da utilização do sulfato de zinco, embora estatisticamente, a única diferença significativa foi obtida quando comparou-se essa solução com o cloreto de sódio ( $p < 001$ ).

Verificou-se que não houve diferença significativa no número de ovos recuperados com a alteração da densidade das substâncias, pela ANOVA. Esses mesmos resultados foram obtidos quando se comparou o desempenho das densidades das soluções isoladamente, pelo teste de Wilcoxon. Ao se realizar esse procedimento, tanto o sulfato de zinco ( $p=0,1168$ ) quanto o nitrato de sódio ( $p=0,8884$ ) não apresentaram variação.

Não houve recuperação de nenhum ovo nas amostras-controle processadas, o que assegurou o sucesso da contaminação.

## DISCUSSÃO

Vários pesquisadores têm comparado diversas técnicas para avaliar a recuperação de ovos de *Toxocara canis*. Entretanto, os métodos empregados são extremamente variáveis, impedindo uma comparação confiável entre os resultados.

Como ponto de partida para comparação das variáveis que poderiam influenciar na recuperação de ovos de *T. canis*, utilizou-se a técnica de Dunsmore et al. (1984), com algumas modificações, uma vez que ela foi considerada como a mais eficiente (OGE; OGE, 2000).

A quantidade de solo para recuperação de ovos de *Toxocara* spp é muito variada, com estudos utilizando 2 g (MATSUO; NAKASHIO, 2005), 5 g (SANTARÉM et al., 1998), 10 g (NUNES et al., 2000; CAPUANO; ROCHA, 2005), 20 g (PAQUET-DURAND et al., 2007), 25 g (DUNSMORE et al., 1984), 40 g (CARDEN et al., 2003), 50 g (OGE; OGE, 2000; GUIMARÃES et al., 2005) e 100 g (COELHO et al., 2001). Nesse ensaio, adotou-se um grama de solo para melhor controle da contaminação artificial com os ovos de *T. canis*, com base no estudo realizado por Nunes et al. (1994), com pequenas modificações.

Alguns estudos têm adotado a filtragem do solo, antes de seu processamento, com peneiras de diferentes malhas (SANTARÉM et al., 1998; MATSUO; NAKASHIO, 2005) ou filtro de café (CARDEN et al., 2003), enquanto outros aboliram o procedimento (NUNES et al., 1994; NUNES et al., 2000; PAQUET-DURAND et al., 2007). Nesse estudo, a filtragem do material reduziu significativamente a quantidade de ovos recuperados, diferentemente do que ocorreu com o estudo realizado por Oge e Oge (2000) ao comparar cinco técnicas diferentes. Entretanto esses autores compararam as técnicas como um todo e não apenas com variáveis como no presente estudo. Provavelmente, a filtragem em gaze reteve os ovos presentes no solo, uma vez que a diferença foi bastante significativa quando se avaliou o material não filtrado ( $p<0,001$ ).

A lavagem de solo antes de seu processamento tem sido utilizada para promover a liberação de sujidades dos ovos, especialmente com o uso Tween (DUBIN et al., 1975; QUINN et al., 1980; KAZACOS, 1983; DUNSMORE et al., 1984; CHILDS, 1985; SANTARÉM et al., 1998; FONROUGE et al., 2000; CAPUANO; ROCHA, 2005), que foi considerado como a solução mais eficiente para o procedimento em amostras contaminadas artificialmente por ovos de *T. canis* (OGE; OGE, 2000).

Em alguns estudos, o NaOH tem sido utilizado para liberação de sujidades dos ovos (FERREIRA et al., 1976; SANTARÉM et al., 1998). Dada e Lindquist (1979) observaram não haver diferença quando da lavagem com NaOH e água. Esse achado foi confirmado nos resultados do presente estudo, onde tanto o uso de Tween como de hidróxido de sódio não diferiram quando do uso de água destilada. Verificou-se que quando o material foi submetido ao tratamento pelo NaOH, houve uma fragilidade dos ovos, com rompimento de sua casca e liberação de seu conteúdo, fenômeno que pode ter sido responsável pela redução do número de ovos no processo de flutuação.

Dessa forma, a água destilada tem sido adotada para lavagem de material, por ser de fácil aquisição e baixo custo (TSUJI et al., 1996; NUNES et al., 2000; CARDEN et al., 2003; DEVERA et al., 2008). Nesse ensaio, recuperou-se um maior número de ovos quando o material foi lavado duas vezes com água destilada.

O tempo de repouso de 12 horas (overnight) tem sido proposto antes do processo de flutuação (Nunes et al., 2000). Entretanto, nesse estudo não houve diferença tanto na obtenção de ovos quando se utilizou o período de duas horas, como no tempo de homogeneização das amostras, ao comparar dois e 30 minutos. Conseqüentemente, o processo pode ser acelerado com repouso por duas horas e homogeneização por dois minutos.

Nesse estudo, houve um aumento significativo do número de ovos recuperados quando foi feita a re-suspensão do material, corroborando Oge e Oge (2000). Observou-se que a re-suspensão favoreceu maior flutuação do solo no sobrenadante, facilitando provavelmente a flutuação dos ovos de *T. canis*. Alguns estudos não utilizaram esse procedimento (DUBIN et al., 1975; CHILDS, 1985; FONROUGE et al., 2000; COELHO et al., 2001; QUEIROZ et al., 2006). Por outro lado, ele foi empregado por diversos autores (FERREIRA et al., 1976; DUNSMORE et al., 1984; SHIMIZU, 1993; TSUJI et al., 1996; SANTARÉM et al., 1998; NUNES et al., 2000; CAPUANO; ROCHA, 2005), o que reforça mais uma vez a dificuldade de se estabelecer uma comparação de dados sobre contaminação ambiental por ovos de *Toxocara* spp.



Em alguns estudos observou-se um aumento na recuperação de ovos com soluções com densidades maiores que 1.20, tais como  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$  ( $d=1.35$ ) (NUNES et al., 1994), o  $\text{MgSO}_4$  associado ao iodeto de potássio ( $d=1.27$ ) (QUINN et al., 1980) e  $\text{NaNO}_3$  ( $d=1.22$ ) (DUNSMORE et al., 1984). Utilizando soluções com a mesma densidade que a do presente trabalho ( $d=1.20$ ), Oge e Oge (2000) verificaram que o  $\text{ZnSO}_4$  mostrou-se como a melhor solução. No presente estudo, na comparação das soluções hiper-saturadas, a recuperação foi maior quando do uso do  $\text{ZnSO}_4$ , embora estatisticamente a diferença só foi observada em relação ao cloreto de sódio. Esses dados mostram que a densidade pode influenciar na recuperação dos ovos.

A textura do solo pode influenciar diretamente na recuperação de ovos ao se comparar diferentes tipos de soluções (NUNES et al., 1994). As amostras contaminadas com areia e solos arenosos seriam mais homogêneas, provavelmente pelo tamanho das partículas. No caso de solo com partículas pequenas, os ovos se aderem mais a partículas de solo e dificultam sua distribuição e recuperação (OGE; OGE, 2000).

No presente estudo, o solo usado foi considerado arenoso-argiloso com partículas pequenas. Entretanto, o percentual de ovos recuperados foi um pouco superior ao obtido por Nunes et al. (2000) ao usar  $\text{ZnSO}_4$  ( $d=1,20$ ), de 8,25%.

Na tentativa de aumentar a recuperação de ovos de *Toxocara* spp, diversos autores realizaram estudos com densidades superiores a 1.20, como os realizados com nitrato de sódio (FERREIRA et al., 1976; SHIMIZU et al., 1993), dicromato de sódio (SANTARÉM et al., 1998; NUNES et al., 2000; QUEIROZ et al., 2006) e sulfato de magnésio (COELHO et al., 2001).

A elevação da densidade do nitrato de sódio e do sulfato de zinco efetuados nesse estudo não mostrou vantagem nesse procedimento, já que o número de ovos recuperados não aumentou com a flutuação nas densidades de 1.25 e 1.30. No caso do sulfato de zinco a maior média, ao contrário, foi obtida quando a solução foi empregada na densidade de 1.20.

Dessa forma, pode-se concluir que as chances de recuperação de ovos de *T. canis* podem ser ampliadas pela re-suspensão do sedimento, enquanto que a filtragem reduz consideravelmente o número de ovos, sendo que a água destilada apresenta propriedades que permitem seu uso na lavagem do solo.

#### **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica (Processo 07/54.934-3).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P., SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmissibles al hombre y a los animales*, 2. ed. Organización Mundial de la Salud: Washington, 1986.
- ALVES, E.G.L.; GUIMARÃES, A.M.; REZENDE, G.F.; RODRIGUES, M.C. Prevalência de ovos de *Toxocara* sp e ovos de *Ancylostoma* sp em amostras de solo de praças públicas e áreas de recreação infantil de Lavras, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, sup. 1, p. 252-252, 2004.
- BEAVER, P.C.; SNYDER, C.H.; CARRERA, G.M.; DENT, J.H.; LAFFERTY, J.W. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics*, v. 9, p. 7-19, 1952.
- CAPUANO, D.M.; ROCHA, G.M. Environmental contamination by *Toxocara* sp eggs in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 47, p. 223-226, 2005.
- CARDEN, S.M.; MEUSEMANN, R.; WALKER, J.; STAWELL, R.J.; MACKINNON, J.R.; SMITH, D.; STAWELL, A.M.; HALL, A.J.H. *Toxocara canis*: egg presence in Melbourne parks and disease incidence in Victoria. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 31, p. 143-146, 2003.
- CHIEFFI, P.P.; MULLER, E.E. Prevalência de parasitismo por *Toxocara canis* em cães e presença de ovos de *Toxocara* sp no solo de localidades públicas da zona urbana do município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 20, p. 367-372, 1976.
- CHILDS, J.E. The prevalence of *Toxocara* species ova in backyards and gardens of Baltimore, Maryland. *American Journal of Public Health*, v. 75, p. 1092-1094, 1985.
- COELHO, L.M.P.S.; DINI, C.Y.; MILMAN, M.H.S.A.; OLIVEIRA, S.M. *Toxocara* spp. eggs in public squares of Sorocaba, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 43, p. 189-191, 2001.
- CORRÊA, G.L.B.; MICHELON, E.; LAGAGGIO, V.R.A.; MOREIRA, W.S., MORAES, R.Q.; LEITE, C.R., RIBAS, H.O.; ADAMY, M.; PIT, G.L.; COLOMBO, F.H. Contaminação do solo por ovos, larvas de helmintos e oocistos de protozoários, em praças públicas de Santa Maria e sua importância em saúde pública. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, p. 137, 1995.

- DADA, B.J.O.; LINDQUIST, W.D. Studies on flotation techniques for the recovery of helminth eggs from soil and the prevalence of eggs of *Toxocara* spp in some Kansas public places. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 174, p. 1208-1210, 1979.
- DEVERA, R.; BLANCO, Y.; HERNÁNDEZ, H.; SIMOES, D. *Toxocara* spp and other helminths in squares and parks of Ciudad Bolívar, Bolivar State (Venezuela). *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas Clínicas*, v. 26, p. 23-26, 2008.
- DUBIN, S.; SEGALL, S.; MARTINDALE, J. Contamination of soil in two city parks with canine nematode ova including *Toxocara canis*: a preliminary study. *American Journal of Public Health*, v. 65, p. 1242-1245, 1975.
- DUNSMORE, J.D.; THOMPSON, R.C.A.; BATES, I.A. Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, Australia. *Veterinary Parasitology*, v. 16, p. 303-311, 1984.
- FAN, CHIA-KWUNG; SU, KUA-EYRE. Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitology International*, v. 53, p. 263-271, 2004.
- FERREIRA, L.F.M; OLIVEIRA, E.L., CAMILLO-COURA, L. Sobre a presença de ovos de *Toxocara*, em praças da cidade do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 10, p. 51-54, 1976.
- FONROUGE, R.; GUARDIS, M.V.; RADMAN, N.E.; ARCHELLI, S.M. Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* sp. en plazas y parques públicos de la ciudad de La Plata. Buenos Aires, Argentina. *Boletín Chileno de Parasitología*, v. 55, p. 83-85, 2000.
- GUIMARÃES, A.M.; ALVES, E.G.L.; REZENDE, G.F.; RODRIGUES, C.M. Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praças públicas de lavras, MG, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 39, p. 293-295, 2005.
- KAZAKOS, K.R. Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, p. 896-900, 1983.
- MAGNAVAL, J.; GLICKMAN, L.T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. *Korean Journal of Parasitology*, v. 39, p. 1-11, 2001.
- MATSUO, J.; NAKASHIO, S. Prevalence of fecal contamination in sandpits in public parks in Sapporo City, Japan. *Veterinary Parasitology*, v. 128, p. 115-119, 2005.

- NUNES, C.M.; SINHORONI, I.L.; AGASSAWARA, S. Influence of soil texture in the recovery of *Toxocara canis* eggs by a flotation method. *Veterinary Parasitology*, v. 53, p. 269-274, 1994.
- NUNES, C.M., PENNA, F.C., NEGRELLI, G.B., ANJO, C.G.S., NAKANO, M.M., STOBBE, N.S. Ocorrência de larva migrans na areia de áreas de lazer das escolas municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, p. 656-658, 2000.
- OGE, H.; OGE, S. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. *Veterinary Parasitology*, v. 92, p. 75-79, 2000.
- PAQUET-DURAND, I.; HERNÁNDEZ, J.; DOLZ, G.; ZUÑIGA, J.J.R.; SCHNIEDER, T.; EPE, C. Prevalence of *Toxocara* spp., *Toxascaris leonina* and ancylostomidae in public parks and beaches in different climate zones of Costa Rica. *Acta Tropica*, v. 104, p. 30-37, 2007.
- QUEIROZ, M.L.; SIMONSEN, M.; PASCHOALOTTI, M.A.; CHIEFFI, P.P. Frequency of soil contamination by *Toxocara canis* eggs in the south region of São Paulo municipality (SP, Brazil) in a 18-month period. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, p. 317-319, 2006.
- QUINN, R.; SMITH, H.V.; GIRDWOOD, R.W.A. Studies on the incidence of *Toxocara* and *Toxascaris* spp. ova in the environmental. 1. A comparison of flotation procedures for recovery of *Toxocara* spp. ova from soil. *Journal of Hygiene*, v. 84, p. 83-89, 1980.
- SANTARÉM, V.A.; SARTOR, I.F.; BERGAMO, F.M.M. Contaminação, por ovos de *Toxocara* sp, de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, p. 529-532, 1998.
- SHIMIZU, T. Prevalence of *Toxocara* eggs in sandpits in Tokushima city and its outskirts. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 55, p. 807-811, 1993.
- TRIOLA, M.F. *Introdução à estatística*. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. 410p.
- TSUJI, O.V.; HERNÁNDEZ, A.R.; BARBABOSA, I.M.; MARÍN, P.N.M.; ZAVALA, J.T.; TORRES, A.P. Contaminación de suelos por huevos de *Toxocara* sp. em parques públicos y jardines de casas-habitación de la ciudad de México. *Boletín Chileno de Parasitología*, v. 51, p. 54-58, 1996.
- ZINKHAM, W.H. A review and reassessment indicating two forms of clinical expression: visceral and ocular. *American Journal of Diseases in Children*, v. 132, p. 627-628, 1978.

**Tabela 1** - Recuperação (%) e número (média  $\pm$  desvio padrão) de ovos de *Toxocara canis* recuperados de amostras de solo (1 g cada) contaminados artificialmente contendo 200 ovos, usando diferentes variáveis em diversas etapas.

<b>Etapa 1</b>	Filtragem do Material antes da Lavagem				
	Sem Filtragem		Com Filtragem		<i>p</i>
Número	Recuperação	Número	Recuperação		
	25,2 $\pm$ 7,9	12,6	2,2 $\pm$ 0,9	1,1	<0,0001
<b>Etapa 2</b>	Tempo de repouso das amostras antes do processamento				
	12 horas		2 horas		<i>p</i>
Número	Recuperação	Número	Recuperação		
	22,6 $\pm$ 9,85	11,3	20,6 $\pm$ 8,2	10,3	0,6523
<b>Etapa 3</b>	Material de pré-lavagem				
	Tween 80 (0,2%)		Água destilada		<i>p</i>
Número	Recuperação	Número	Recuperação		
	13,1 $\pm$ 4,3	6,55	12,9 $\pm$ 4,0	6,45	0,8764
<b>Etapa 4</b>	Material de Lavagem				
	NaOH 0,1N		Água Destilada		<i>p</i>
Número	Recuperação	Número	Recuperação		
	9,5 $\pm$ 5,9	4,75	10,3 $\pm$ 5,5	5,15	0,9453
<b>Etapa 5</b>	Tempo de homogeneização (minutos)				
	2		30		<i>p</i>
Número	Recuperação	Número	Recuperação		
	18,9 $\pm$ 7,9	9,45	12,5 $\pm$ 5,0	6,25	0,1934
<b>Etapa 6</b>	Re-suspensão da amostra				
	Realizada		Não realizada		<i>p</i>
Número	Recuperação	Número	Recuperação		
	14,3 $\pm$ 3,5	7,15	8,3 $\pm$ 3,0	4,15	0,0059

**Tabela 2** – Diferença entre médias de recuperação (%) e número de ovos (N) de *Toxocara canis* recuperados de amostras de solo (1 g cada) contendo 200 ovos, usando cloreto de sódio (NaCl), dicromato de sódio (Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), nitrato de sódio (Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e sulfato de zinco (Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) na densidade 1.20 g/cm<sup>3</sup>.

Nome das Soluções									
NaCl		Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		Zn <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Na <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>		MgSO <sub>4</sub>	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
8,5 ab	4,25	14 a	7,0	21,5 ac	10,75	16 a	8,0	14,5 a	7,25

Diferença entre número médio de ovos recuperados (N) acompanhada de letras diferentes indica diferença significativa ( $p < 0,001$ ).