

# AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE CONCENTRAÇÃO DE OVOS DE *TOXOCARA CANIS* A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS

**Kathleen de Almeida Ferreira<sup>1</sup>; Jadson Nascimento Borges<sup>2</sup>; Priscylla Marcelly Vilanova Oliveira<sup>3</sup>; Ellen Monteiro Ribeiro Santos<sup>4</sup>; Aristeu Vieira da Silva<sup>5</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda do Curso Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [kathleen\\_fsa@hotmail.com](mailto:kathleen_fsa@hotmail.com)
2. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando do Curso Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [jadsonnascimento@outlook.com](mailto:jadsonnascimento@outlook.com)
3. Estagiária do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Graduanda do Curso Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [priscylla.marcelly@hotmail.com](mailto:priscylla.marcelly@hotmail.com)
4. Estagiária do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Graduanda do Curso Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [ellenmonteiro28@hotmail.com](mailto:ellenmonteiro28@hotmail.com)
5. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana – Bolsista de Produtividade em Pesquisa CNPq, e-mail: [aristeuvsilva@uefs.br](mailto:aristeuvsilva@uefs.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** *Toxocara*; ovos; concentração

## INTRODUÇÃO

O *Toxocara canis* é um nematelminto parasito do cão causador de uma infecção em humanos denominada toxocaríase, sendo assim importante agente zoonótico. Esta espécie é do gênero *Toxocara* que faz parte da família Ascaridae, vive no intestino delgado do cão e de canídeos selvagens (Rey, 2001).

O ciclo do *Toxocara* spp. inclui uma fase no solo onde os ovos liberados no ambiente juntamente com as fezes dos hospedeiros definitivos (como os cães), se desenvolvem e a larva dentro do ovo atinge o estágio infectante (L3). Esses ovos são muito resistentes aos fatores ambientais e podem permanecer viáveis durante meses (Neves et al., 2011). Dessa maneira, os trabalhos realizados buscando avaliar o nível de contaminação do ambiente por *Toxocara* spp. são feitos em amostras de solo em geral pela técnica de flutuação com soluções de alta concentração de soluto, fazendo assim com que os ovos flutuem e se concentrem na superfície da solução líquida. Apesar dessa técnica ser eficaz na visualização de ovos de *Toxocara* spp. sendo possível até observar se estão larvados, morulados ou inférteis, não é possível fazer a diferenciação entre as espécies *Toxocara canis* e *Toxocara cati* (que tem por hospedeiro definitivo felídeos, inclusive os gatos domésticos), mas, graças aos avanços da biologia molecular, trabalhos de distinção entre as espécies foram realizados utilizando-se ferramentas de análise molecular. Outro ponto um tanto negativo da técnica é que os resultados, ou seja, a quantidade de ovos encontrados, pode variar em função das condições em que se encontra o solo coletado para a análise, o trânsito de cães e gatos no local também pode influenciar. Além disso, apesar da técnica empregada em geral ser a de flutuação, não existe um protocolo padrão para a mesma, e os pesquisadores terminam por utilizar soluções com solutos diferentes e em diferentes concentrações, forças diferentes de centrifugação, etc.

Pelo exposto, justifica-se o nosso objetivo de padronização de uma técnica para concentração de ovos de *Toxocara* spp. em solo, tornando mais fácil a realização e a comparação entre os trabalhos nesse âmbito, permitindo uma concentração maior de ovos e assim ajudando na avaliação da contaminação do ambiente e aumento da eficiência das técnicas de amplificação de DNA, como por exemplo a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

## MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia consistiu em quatro etapas em que foram testados quatro fatores diferentes. Cada etapa possuía dois testes distintos denominados “A” e “B”. Ao final de cada etapa era feita análise estatística utilizando o Bioestat 5.0 para eleger o melhor teste ou procedimento (“A” ou “B”), ou seja, em qual conseguiu-se uma contagem mais significativa de ovos.

## **1. ETAPA 1- TESTE DO SOBRENADANTE (DESCARTE OU ANÁLISE)**

Primeiramente foi realizada uma diluição em água destilada dos ovos de *T. canis* que estavam em tampão EDTA cedidos pelo Prof. Vamilton Santarém, da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), afim de se obter uma solução com 100 ovos a cada 1 ml de água destilada então, em 24 tubos Falcon 1 ml dessa solução era adicionada à 1 g de solo previamente esterilizado em autoclave à 121 °C por 1 h, após isso, 6,0 ml de água era adicionado e as amostras eram mantidas em repouso por pelo menos 12 horas.

### **1.1. Sobrenadante**

Passado o período de repouso o sedimento era separado do sobrenadante: em 12 repetições, o sobrenadante era desprezado (teste “A”) e nas outras 12 era transferido para outros tubos Falcon (teste “B”) onde era centrifugado a 2500 rpm/min por 5 min e 25 µl da porção do fundo do tubo era coletado com auxílio de micropipeta e posto em lâmina para análise em microscopia óptica com aumento de 10x, feito isso, toda essa etapa para análise do sobrenadante era repetida e este reanalisado.

### **1.2. Sedimento**

Posteriormente 6,0 ml de água destilada era adicionada ao sedimento das 24 repetições que depois eram homogeneizadas por 2 min e centrifugadas a 2500 rpm/min por 5min. Após a centrifugação em 12 repetições o sobrenadante era desprezado e em 12 era transferido para outros tubos Falcon para realização da etapa de análise do sobrenadante anteriormente descrita. Então essa fase de acréscimo de água ao sedimento, homogeneização, centrifugação, separação do sobrenadante, descarte e análise do mesmo era repetida mais uma vez.

### **1.3. Etapa de Flutuação**

Nesta fase 10,0 ml da solução concentrada de sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ )  $d= 1.350 \text{ g/cm}^3$  era adicionada ao sedimento das 24 amostras, estas eram então homogeneizadas por 2min e centrifugadas a 2500 rpm/min por 5min. Após a centrifugação o tubo Falcon era completado com a solução de  $ZnSO_4$  até a borda para formação de menisco. Uma lamínula era então colocada sobre esse menisco e após repouso de 5 min a lamínula era retirada e colocada sobre uma lâmina para análise sob microscopia óptica com aumento de 10x.

## **2. TESTE DO TEMPO DE HOMOGENEIZAÇÃO**

O melhor procedimento eleito anteriormente foi utilizado para realização dessa próxima etapa em que foi testado qual o melhor tempo de homogeneização após adicionar o  $ZnSO_4$  para recuperar mais ovos, se no tempo de 2 min (teste “A”) ou 30 min (teste “B”). Para tal em 12 amostras a homogeneização foi feita por 2 min e em outras 12 no tempo de 30 min.

### 3. TESTE DO TEMPO DE REPOUSO ANTES DA LEITURA

Eleito o melhor procedimento em relação ao sobrenadante e o melhor tempo de homogeneização, estes foram utilizados nessa próxima etapa em que se verificou se o melhor tempo de repouso antes da leitura é de 10 min (teste “A”) ou 15 min (teste “B”). Um tempo foi testado em 12 amostras e o outro testado em outras 12 amostras.

### 4. TESTE DA FORÇA DE CENTRIFUGAÇÃO

Os melhores procedimentos anteriormente encontrados foram utilizados na realização dessa última etapa em que se verificou se a melhor força de centrifugação para recuperação de uma maior quantidade de ovos é de 3000 rpm/min (teste “A”) ou 3500 rpm/min (teste “B”). Para tal, em 12 amostras foi aplicada a força de centrifugação de 3000 rpm/min e em outras 12 a força de 3500 rpm/min em ambos os casos o tempo de centrifugação foi de 5 min.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores médios e os desvios-padrão das contagens de ovos nas etapas de 1 a 4, segundo os testes e por total na etapa.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da contagem de ovos de *Toxocara canis* nos testes para padronização da técnica de flutuação com sulfato de zinco. Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, 2016.

Testes	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
“A”	0,00 <sup>A</sup> ±0,00 (0) <sup>1</sup>	0,16 <sup>B</sup> ±0,38 (2)	3,60 <sup>C</sup> ±8,97 (44)	9,00 <sup>D</sup> ±7,42 (108)
“B”	0,41 <sup>A</sup> ±0,79 (5)	0,00 <sup>B</sup> ±0,00 (0)	6,25 <sup>C</sup> ±7,61 (75)	2,33 <sup>E</sup> ±6,24 (28)
A+B	0,20 <sup>b</sup> ±0,58	0,08 <sup>b</sup> ±0,28	4,95 <sup>a</sup> ±8,24	5,66 <sup>a</sup> ±7,52
Total de Ovos	5	2	119	136

Sobrenadante (Etapa1): análise (Teste”A”), descarte (Teste”B”); Tempo de homogeneização (Etapa2): 2 min (Teste”A”), 30 min (Teste”B”); Tempo de repouso (Etapa3): 10 min (Teste”A”), 15 min (Teste”B”); Força de centrifugação (Etapa4): 3000 rpm/min (Teste”A”), 3500 rpm/min (Teste”B”).

Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Friedman ( $p>0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ( $p>0,05$ ) ou teste t ( $p>0,05$ ).

<sup>1</sup> Número de ovos em cada teste.

Na etapa 1 como a diferença entre as médias de ovos dos testes “A” e “B” não foram significativas e nenhum dos cinco ovos encontrados no teste “B” estava presente no sobrenadante analisado, pode-se tomar como melhor procedimento na etapa 1 o desprezo do sobrenadante, visto o menor tempo e recurso necessário para execução em relação ao outro. Essa diferença não significativa entre os testes “A” e “B” deve-se muito provavelmente ao período de repouso de pelo menos 12 h que proporciona a decantação do solo e dos ovos formando assim o sedimento. Os ovos não ficam no sobrenadante (formado principalmente por água) por serem mais densos que o mesmo.

Na etapa 2 apesar de não haver diferença significativa entre as médias do teste “A” e

“B” pode-se tomar como melhor procedimento a homogeneização por dois min pelo fato de no teste “B” o tempo ser menor, otimizando o tempo de execução da técnica. Essa diferença não significativa entre os testes “A” e “B” pode ser porquê qualquer um dos tempos é suficiente para que o sulfato se misture sedimento.

Na etapa 3 não houve diferença significativa entre as médias dos testes “A” e “B”, mas essa é uma etapa significativa na técnica em geral para recuperação de ovos e pode-se observar na Tabela 1. que o número de ovos encontrados em um maior tempo de repouso (15 min) foi maior em relação ao menor tempo (10 min), assim, considerou-se “B” como melhor procedimento para a próxima etapa. O tempo de repouso é um fator importante pois, os ovos que estavam no sedimento (solo) precisam de tempo para percorrer o denso sobrenadante (ZnSO<sub>4</sub>) e chegar ao menisco, local este, onde a lamínula a ser analisada é colocada.

Na etapa 4, houve diferença significativa entre as médias das etapas “A” e “B”, com a primeira cerca de 4x melhor que a segunda pois, encontrou-se uma maior quantidade de ovos. Isso pode ser explicado da seguinte maneira: a 3500 rpm/min a força de centrifugação é muito grande causando a forte compactação do sedimento e impedindo os ovos que estão no interior deste, de sair e, atravessar o sobrenadante para chegar ao menisco. Os ovos encontrados nas amostras centrifugadas a essa força podem ser alguns que estavam na superfície do sedimento estando assim livres para flutuar.

Nessa última etapa apesar de a média de ovos encontrados não diferir significativamente da média da 3ª etapa, uma maior quantidade de ovos foi encontrada, o que era esperado, visto que, nas etapas anteriores os testes eleitos melhores foram aplicados na 4ª etapa. Ou seja, no teste “A” dessa última etapa, executou-se a melhor técnica geral assim, podemos dizer que a média das 12 repetições em que foi feito esse teste, é também a média da melhor técnica encontrada nesse trabalho, sendo esta de nove ovos a cada 100 pois, em cada repetição haviam em média 100 ovos. Considerando que uma fêmea adulta de *T. canis* pode liberar por dia mais de 25 mil ovos, essa taxa de recuperação da técnica é bem positiva.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A melhor técnica apresenta tais procedimentos: descarte do sobrenadante, tempo de homogeneização de 2 min após acréscimo de sulfato de zinco ao sedimento (ZnSO<sub>4</sub>), tempo de repouso antes da leitura de 15 min e força de centrifugação de 3500 rpm/min por 5 min.
- A taxa de recuperação de ovos de *T. canis* por essa técnica aqui desenvolvida é de em média 9 ovos a cada 100.
- A técnica desenvolvida nesse trabalho pode ser utilizada para recuperação de ovos de *Toxocara canis* de solo artificialmente contaminado e muito provavelmente para amostras de solo naturalmente contaminadas por *Toxocara* spp.
- Um teste de diluição é necessário para determinação da sensibilidade da técnica.

## REFERÊNCIAS

- REY, L. 2001. *Parasitologia*, 3ed, pp.617-619. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- NEVES, D.P. et al. 2011. *Parasitologia humana*, 11ed, pp. 271-273. São Paulo, Atheneu.