

---

## ISOLADO DE *Lagochilascaris minor*: PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DE OVOS INFECTANTES

---

Jayrson Araújo de Oliveira,<sup>1</sup> Carlos Augusto Lopes Barbosa,<sup>2</sup> Miguel Alípio Vieira,<sup>2†</sup> Julieta Machado Paçô,<sup>2</sup> Alessandra da Silva Carrijo,<sup>3</sup> Marcelo Pires Fiorini<sup>3</sup> e Dulcinéa Maria Barbosa Campos<sup>2</sup>

### RESUMO

*Lagochilascaris minor* tem sido mantido no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Goiás, desde 1989, utilizando-se o modelo experimental: camundongo e gato doméstico. No início destes estudos, ovos infectantes do parasito eram obtidos por dissecação de alças uterinas de fêmeas de *L. minor* recuperadas de lesões cervicais humanas. Posteriormente, observou-se que em gatos infectados experimentalmente os parasitos localizam-se, preferencialmente, em tecidos da rino e orofaringe. Nestes tecidos, vermes são encontrados no interior de tumorações que se fistulam para a luz do tubo digestivo liberando grande quantidade de ovos nas fezes destes animais. Visando otimizar a obtenção de ovos eliminados pelas fêmeas de *L. minor*, propôs-se o emprego do método de sedimentação espontânea acrescido do método de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (Faust e cols.) em fezes de gatos infectados. A utilização destes métodos permitiu obter ovos larvados, viáveis, livres de detritos fecais e em maior proporção do que por dissecação de alças uterinas do verme.

**DESCRITORES:** Isolado de *Lagochilascaris minor*. Ovos infectantes.

### INTRODUÇÃO

A lagochilascariase, infecção provocada pelo ascarídeo *Lagochilascaris minor*, é considerada uma doença emergente e restrita ao continente americano. O Brasil lidera a casuística mundial, sendo a maioria

---

1 Departamento de Morfologia – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Departamento de Microbiologia, Imunologia, Patologia e Parasitologia – IPTSP/UFG

3 Acadêmicos de Medicina, UFG

† In memoriam

Endereço para correspondência: Rua Delenda Rezende de Melo eq. com 1ª Avenida., Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia – GO. E-mail: jayrson@icb2.ufg.br ou jayrson@bol.com.br

Recebido para publicação em 28/4/2001. Revisto em 10/3/2002. Aceito em 3/4/2002.

dos casos provenientes da região amazônica, principalmente, dos estados do Pará, Tocantins, Acre e Rondônia (Fraiha 1989; Paçô & Campos 1998).

Acredita-se que o homem seja hospedeiro anormal de *L. minor* e que o parasito tenha como habitat o aparelho digestivo de felídeos silvestres (Leiper 1909). Ovos infectantes, contendo larvas de 3º estágio de *L. minor*, foram obtidos por Campos et al. (1989) por dissecação de útero de fêmeas do verme em lesão da paciente A.F.S.. Posteriormente, o ciclo evolutivo experimental deste parasito foi descrito por Campos et al. (1992) infectando, via oral, camundongos (C57BL/6) com ovos larvados de *L. minor*. Gatos domésticos (*Felis catus domesticus*), alimentados com carcaças de camundongos infectados, foram utilizados como hospedeiro definitivo do parasito. Nesses animais, os parasitos são encontrados especialmente nos tecidos da rino e orofaringe (Campos et al. 1993a, 1993b). Dados experimentais permitem supor que, na primoinfecção, o homem se infecte ingerindo carne de roedores silvestres contendo larvas infectantes encistadas (Campos et al. 1990; 1992; Paçô et al. 1991, 1992, 1999).

Ovos recuperados de alças uterinas de fêmeas adultas de *L. minor* apresentam-se isentos de detritos fecais, entretanto grande quantidade destes mostram-se inférteis, além de se considerar o enorme tempo dispendido na retirada destes ovos.

O emprego do método de sedimentação espontânea em fezes de gatos infectados para obtenção de ovos *L. minor* possui o inconveniente de apresentar excesso de detritos fecais, dificultando a contagem dos ovos, além de obter um inóculo contaminado por bactérias, prejudicial, portanto, para o hospedeiro intermediário. O interesse em otimizar procedimentos laboratoriais motivou a idealização de um método mais eficiente na obtenção de ovos infectantes de *L. minor*.

Através da utilização da sedimentação espontânea seriada das fezes e flutuação dos ovos em sulfato de zinco (densidade de 1.180) obteve-se um inóculo constituído por ovos embrionados, viáveis, contendo o mínimo de detritos fecais.

Para avaliar a viabilidade dos ovos obtidos através dos procedimentos mencionados, os mesmos foram examinados ao microscópio óptico e administrados a camundongos, por via oral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1) Animais

Foram utilizados dez camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 como hospedeiros intermediários e dez gatos (*Felis catus domesticus*) como hospedeiros definitivos de *L. minor*, criados no biotério do IPTSP-UFG.

## 2) Vias de inoculação

### 2a) Camundongos

Cada animal, do grupo de 10 camundongos C57BL/6, foi inoculado via oral, através de sonda esofágica, com  $10^3$  ovos infectantes de *L. minor*, isolado HGS, conforme Campos et al. (1989).

### 2b) Gatos

Cada animal, do grupo de 10 gatos (*Felis catus domesticus*), foi alimentado com aproximadamente 50 nódulos, contendo larvas de *L. minor* encistadas em carcaças de camundongos previamente infectados.

## 3) Amostras fecais

Fezes de gatos, infectados experimentalmente com *L. minor*, foram colhidas a partir do 20º dia após a inoculação (DAI), para execução das técnicas de sedimentação espontânea (Neves, 1991) e centrífugo-flutuação (Faust, 1939).

## 4) Obtenção de ovos infectantes – Emprego do método de sedimentação espontânea

Para obtenção de ovos, todo o bolo fecal de 24 horas de cada um dos animais infectados (*Felis catus domesticus*) foi submetido ao método de sedimentação espontânea, distribuindo-se a emulsão obtida das fezes em 14 a 20 cálices, dependendo da quantidade de fezes. Os sedimentos foram lavados em solução de formalina 1%, aproximadamente 7-8 vezes, durante dois dias até a obtenção de um sobrenadante limpo e transparente. Após este período, desprezou-se o sobrenadante, concentrando-se o sedimento em apenas um cálice com solução de formalina a 1%, à temperatura ambiente (23-32º), durante um período de aproximadamente 40 dias para obtenção de ovos infectantes (Campos et al. 1989, 1990, 1992).

Os ovos de ascarídeos possuem a propriedade de aderir à superfície de vidro. Por esta razão, e com o objetivo de se obter uma maior quantidade de ovos, utilizou-se parafina na parede interna dos cálices, retirando-se o líquido sobrenadante por um sistema de aspiração.

## 5) Concentração de ovos infectantes (Método de Faust et al.)

O emprego do método de Faust e cols. implica colher estádios de parasitos (cistos e trofozoítas de protozoários, ovos leves de helmintos) da película superficial da solução de sulfato de zinco a 33%, densidade 1.180.

Com o objetivo de reduzir a quantidade de detritos presentes em amostras fecais, o sedimento, obtido através do procedimento anterior (sedimentação espontânea), foi dividido em várias alíquotas de aproximadamente 4 ml, em tubos de ensaio de fundo cônico, centrifugado

para retirada da solução de formalina e posteriormente submetido ao método de Faust e cols. (cinco centrifugações).

Visando obter um maior número de ovos presentes no material centrifugado pelo método de Faust e cols. (cinco centrifugações), colheu-se, aproximadamente, 1 ml do sobrenadante e não apenas o material da película superficial. O volume colhido (1 ml) era transferido para tubos de ensaio contendo, desta vez, aproximadamente 9 ml de solução fisiológica a 0,87% para retirada da solução de sulfato de zinco. Após três centrifugações o sedimento obtido constituía-se no inóculo livre de detritos fecais, representado por ovos infectantes contendo larvas de 3º estágio em seu interior.

#### 6) Contagem dos ovos

Os ovos foram contados em 21 amostras de fezes submetidas ao método de sedimentação espontânea (Faust e cols. 1934) em cinco centrifugações de amostras fecais e, finalmente, no concentrado final obtido das cinco centrifugações.

Para avaliar a eficiência da metodologia proposta (sedimentação espontânea seriada associada ao método de Faust e cols.), comparou-se a contagem dos ovos obtidos após o emprego de cada um dos métodos.

Para detectar falha na contagem dos ovos, comparou-se o número de ovos encontrado no concentrado final, recuperado pelo método de Faust e cols., com a somatória das contagens de cada uma das cinco centrifugações.

Para contagem dos ovos utilizaram-se três alíquotas de 0,01 ml do sedimento, previamente homogeneizado, colocado entre lâmina e lamínula e obteve-se a média aritmética das três contagens.

#### 7) Índice de infectividade dos ovos

A infectividade dos ovos foi avaliada microscopicamente após compressão destes, entre lâmina e lamínula, observando a mobilidade das larvas e a inoculação de camundongos C57BL/6. Avaliou-se a porcentagem de larvas recuperadas em relação ao número de ovos inoculados, conforme Barbosa (1996).

#### 8) Inativação de ovos

Visando impedir contaminação do meio ambiente, todo o material utilizado nos processos de coleta dos ovos, inclusive o líquido sobrenadante do processo de limpeza do sedimento, foi imerso em solução de lugol 1%, por um período de 24 horas, para inativação dos ovos de *L. minor* remanescentes, conforme Oliveira et al. (1995).

## 9) Cultura de ovos uterinos

Cinco gatos foram sacrificados após coleta das fezes. Os exemplares fêmeas de *L. minor* recuperadas foram utilizados para obtenção de ovos e execução de cinco culturas de ovos uterinos conforme Campos et al. (1989). Depois de quarenta dias obteve-se o percentual de ovos larvados e não larvados de cada cultura.

## 10) Análise de dados

A análise de dados foi feita por teste t (Student).

## RESULTADOS

Os números de ovos recuperados de fezes de gatos domésticos infectados experimentalmente, após emprego do método de sedimentação espontânea (SE) e do método de Faust e cols. (MF), encontram-se expressos na Tabela I.

*Tabela I.* Número de ovos obtidos através do método de sedimentação espontânea (SE) e do método de Faust e cols. (MF). Ovos recuperados em cada uma das cinco centrifugações e somatória das contagens de cada centrifugação ( $\Sigma$  centr.)

Amostras	Número de ovos SE	Centrifugações (MF)						Nº de ovos concentrado final
		Ovos recuperados						
		1ª centr.	2ª centr.	3ª centr.	4ª centr.	5ª centr.	$\Sigma$ centr.	
1	72.400	35.000	23.600	5.800	4.000	--	68.400	68.400
2	98.183	20.100	17.700	15.000	10.200	2.100	65.100	58.100
3	67.530	21.350	7.000	7.200	8.700	3.850	48.100	54.798
4	62.300	35.250	10.000	3.000	1.500	250	50.000	47.340
5	151.800	85.000	23.000	6.500	2.000	1.500	118.000	144.267
6	94.933	70.500	11.750	13.000	3.000	500	98.750	88.600
7	410.050	163.350	31.250	20.000	11.750	7.500	233.850	231.467
8	93.000	91.250	6.250	3.750	1.750	1.500	104.500	103.000
9	39.160	24.500	10.000	6.000	1.500	334	42.334	42.100
10	76.670	55.165	8.300	2.165	2.330	665	68.625	66.025
11	24.800	20.000	6.500	2.084	910	1.000	30.494	29.900
12	69.300	86.167	10.334	1.334	1.334	--	99.169	99.836
13	87.534	73.000	9.667	1.400	800	900	85.767	85.756
14	17.787	12.500	3.400	400	300	300	16.900	16.100
15	11.750	9.500	3.200	1.000	600	133	14.433	13.400
16	9.200	5.334	1.334	134	534	67	7.403	7.105
17	21.306	25.500	2.067	867	200	333	28.967	27.470
18	25.307	21.067	12.000	700	900	--	34.667	34.233
19	15.200	3.600	1.200	400	567	1.166	6.933	7.733
20	21.600	3.600	1.067	733	567	233	6.200	5.450
21	147.000	47.800	32.266	22.800	12.400	5.500	120.766	117.458

Método de sedimentação espontânea (SE): contagem dos ovos do sedimento antes da centrifugação.

Método de Faust e cols. (MF): contagem dos ovos concentrados em um único tubo após as cinco centrifugações.

$\Sigma$  centr.: somatória da contagem de cada uma das cinco centrifugações.

Centr.: Centrifugação

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de ovos recuperados pelo método de Faust e cols. (MF) e o somatório das cinco centrifugações ( $\Sigma$  centr.) para  $\alpha = 0,05$

O percentual de ovos larvados obtidos de cultura de ovos uterinos e de cultura de fezes de gatos infectados com *L. minor* encontra-se na Tabela 2.

Observou-se que 98,13% dos ovos obtidos das fezes de gatos infectados e 2,7% dos ovos uterinos embrionaram-se (Tabela 2).

A maior parte dos ovos recuperados foi obtida nas duas primeiras centrifugações. Em relação ao número de ovos recuperados ocorreu um equilíbrio entre a quarta e a quinta centrifugações, porém observou-se um decréscimo do número de ovos a cada centrifugação (Tabela 2).

Tabela 2. Ovos larvados obtidos de cultura de ovos uterinos e de cultura de ovos de fezes de gatos infectados com *L. minor*

Amostra	Percentagem de ovos larvados obtidos de alças uterinas	Percentagem de ovos larvados obtidos de fezes
1	2,00	99,46
2	4,00	97,40
3	4,50	99,00
4	2,30	95,48
5	1,30	99,30
Média	2,70	131

Pelo teste t verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre o processo de sedimentação espontânea e o método de Faust e cols. (Tabela 1). Observou-se também que não houve diferença significativa entre a contagem de ovos recuperados pelo método de Faust e cols. e a somatória das cinco contagens das centrifugações ( $\Sigma$  centr.) para um  $\alpha=0,05$  (Tabela 1).

## DISCUSSÃO

Jorgensen (1978) afirmou que em cultura de ovos de *Ascaris suum*, obtidos de fezes de animais infectados, mais de 95% embrionaram-se, sugerindo que os ovos que passam naturalmente pelo trato intestinal são mais indicados que os uterinos para serem utilizados em infecções experimentais por *Ascaris*. Essa observação coincide com os dados encontrados no presente trabalho, em que se observou que 98% dos ovos obtidos de fezes e 2,7% dos ovos uterinos de *L. minor* embrionaram-se (Tabela 2). O processo de evolução desses ovos no trato genital da fêmea do parasito e sua passagem natural pelo trato intestinal do hospedeiro podem interferir positivamente no alto índice de fertilidade. Oksanen et al. (1990), comparando o embrionamento de ovos de *Ascaris* retirados de alças uterinas e ovos eliminados nas fezes, encontraram uma igualdade na infectividade dos mesmos, sugerindo que a utilização de ovos uterinos em infecções

experimentais fosse mais indicada. Neste trabalho observou-se um número maior de ovos não larvados quando recuperados de alças uterinas, fato que provavelmente deve estar relacionado com coleta de ovos ainda não totalmente evoluídos (Tabela 2). Estes dados interferem positivamente na escolha do método de obtenção de ovos das fezes dos animais infectados para serem utilizados em infecções experimentais com *L. minor*.

A grande quantidade de ovos recuperados, livres de detritos fecais, e o elevado percentual de ovos larvados obtidos através do emprego dos métodos de sedimentação espontânea e centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (método de Faust e cols.) são fatores que indicam a escolha desta metodologia em infecções experimentais com *L. minor*, na manutenção do "isolado" de *L. minor* em laboratório.

A associação dos métodos de sedimentação espontânea e de Faust e cols. permite obter ovos viáveis e em maior proporção do que aqueles obtidos em alças uterinas de vermes fêmeas.

Repetidas centrifugações do método de Faust e cols. constituem um procedimento importante no sentido de recuperar um maior número de ovos das amostras fecais examinadas.

Embora o método das cinco centrifugações ocupe um tempo considerável, ele ainda é indicado como o de preferência, pois o processo de retirada dos ovos das alças uterinas das fêmeas de *L. minor*, além de necessitar de mais tempo, é também menos eficiente quanto ao número de ovos larvados.

## ABSTRACT

*Lagochilascaris minor* isolate: a procedure for obtaining infecting eggs

*Lagochilascaris minor* has been maintained in the Department of Parasitology of the Federal University of Goiás, since 1989, using as experimental models the domestic cat and the mouse. At first, the infecting eggs of the parasite were obtained from the dissection of the uteri of *L. minor* females recovered from human cervical lesions. Afterwards it was observed that, in experimentally infected cats, the parasites are preferentially localized in tissues from rhino or oropharynx. In these tissues the worms are found in the interior of tumours that forms a fistula to the lumen of the digestive tube and release a great quantity of eggs in the feces of these animals. The spontaneous sedimentation method in association with the centrifugo-flotation in zinc sulphate method (Faust et al.) was proposed, aiming to optimize the obtention of the female eliminated eggs of *L. minor* in feces of infected cats.

**KEYWORDS:** *Lagochilascaris minor* isolate. Infecting eggs.

## REFERÊNCIAS

1. Barbosa CAL. *Avaliação da eficácia do ivermectin sobre fases do ciclo evolutivo experimental de Lagochilascaris minor Leiper, 1909*. Dissertação de Mestrado, 1996.
2. Campos DMB, Bressan MCRV, Rosa ZS. Considerações sobre a evolução do *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. I - Número de mudas de larvas no interior do ovo. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 25. Florianópolis, 1989. Resumos. p.198.
3. Campos DMB, Freira Filha LG, Vieira MA, Paço JM, Maia MA. Experimental life cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Rev Inst Med trop São Paulo* 34:277-287, 1992.
4. Campos DMB, Freire Filha LG, Vieira MA. Ciclo evolutivo do *Lagochilascaris minor* Leiper 1909. Resultados preliminares. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Natal, 1990. Resumos. p. 163-164.
5. Campos DMB, Paço JM, Barbosa CAL. Ocorrência do ciclo auto-infectante na lagochilascariase felina experimental. *Rev Bras Parasit Vet* 2(suppl.):61, 1993a.
6. Campos DMB, Paço JM, Maia MA, Farah ARS. Lagochilascariase experimental, avaliação clínica e histopatológica. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Fortaleza, 1993b. Resumos. p.346.
7. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom V, Peres C & Lincicone DR. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J Parasitol* 25:241-262, 1939.
8. Frahia H, Leão RNQ, Costa FSA. Lagochilascariase humana e dos animais domésticos. *Zoon Rev Inst* 1:25-33, 1989.
9. Guerreiro J, Mercadante MLP. Cultura *in vitro* de larvas de *Ascaris suum*: simplificação do meio de cultura. *Rev Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo* 13:391-399, 1976.
10. Jorgensen R.J. Isolation of *Ascaris suum* eggs for experimental purposes. *Acta Vet Scand* 19:147-149, 1978.
11. Leiper RT. A new nematode worm from Trinidad, *Lagochilascaris minor*. *Proc Zool Soc Lond* 4:742-743, 1909.
12. Neves DP. *Parasitologia Humana*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. p.464-467.
13. Oliveira JÁ, Vieira MA, Silva AC, Barbosa CAL., Veloso AP. Ação de agentes químicos e físicos sobre ovos de *Lagochilascaris minor*. (Leiper, 1909). *Rev Patol Trop* 24:301-311, 1995.
14. Oksanen A, Eeiksen L, Roepstorff A, Ilsoe B, Nansen P & Lind P. Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs. A comparison of eggs collected from worm uteri with eggs isolated from pig faeces. *Acta vet Scand* 31:393-398, 1990.
15. Paço JM. & Campos DMB. *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909: nove décadas de revisão bibliográfica *Rev Patol Trop* 27:11-34, 1998.
16. Paço JM, Campos DMB, Barbosa CAL. Importância do hospedeiro intermediário no ciclo evolutivo experimental de *Lagochilascaris minor*. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém, 1992. Resumos, p. 100
17. Paço JM, Campos DMB, Maia MA, Freire Filha LG, Vieira MA. *Lagochilascaris minor* infecção experimental em *Dasyprocta agouti*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33 (supl):s40, 1991.
18. Paço JM, Campos DMB, Oliveira JA. Wild rodents as experimental intermediate hosts of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:441-449, 1999.