COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE CENTRÍFUGO-FLUTUAÇÃO UTILIZADOS PARA A RECUPERAÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS EM AMOSTRAS DE AREIA

Viviana Cauduro Matesco, Marilise Brittes Rott e Márcia Bohrer Mentz 1

RESUMO

A deposição de fezes de animais no ambiente constitui um problema de saúde pública que deve ser avaliado e controlado. Neste contexto, os geohelmintos desempenham um papel patogênico importante tanto no ser humano quanto nos animais. Este estudo objetivou comparar a eficiência de três métodos de centrífugo-flutuação utilizados na rotina de laboratório para a recuperação de ovos de helmintos do solo em 50 amostras coletadas aleatoriamente em areias próximas ao estuário Guaíba, zona sul do município de Porto Alegre, RS, Brasil. As amostras de areia foram submetidas aos métodos de Faust et al. modificado, Kazacos modificado e Ruiz et al.. Os resultados foram expressos em número e/ou percentual de amostras positivas e de recuperação de ovos entre os métodos utilizados. Do total de amostras analisadas, 7/50 (14%) foram positivas para ovos de *Toxocara* spp. e 1/50 (2%) apresentou também ovos de ancilostomídeos. Dentre os métodos utilizados, o de Kazacos recuperou ovos de helmintos em quatro das sete amostras positivas. As taxas de recuperação pelos demais métodos foram as seguintes: Ruiz et al. (3/7) e Faust et al. (2/7), utilizando-se amostras de 6g, e (1/7) com amostras de 30g. Os dados do presente estudo não mostraram diferenças entre os métodos utilizados para a recuperação de ovos de helmintos do ambiente.

DESCRITORES: Métodos de flutuação. Areia. *Toxocara* spp. Ancilostomídeos. Saúde Pública. Zoonoses.

ABSTRACT

A comparative study between commonly used laboratory flotation methods for recovering helminth eggs from sand samples

Animal fecal deposition in the environment is a public health problem with a potential risk for pathogenic agents like parasites. In epidemiological surveys, the evaluation of soil contamination requires an efficient d easy method for the isolation of parasite eggs from soil samples. The present study was performed aiming to compare flotation methods to test their efficacy in recovering helminth eggs from 50 sand samples, from a sandy area, in the city of Porto Alegre, Rio Grande do

Endereço para correspondência: m.mentz@uol.com.br

Recebido para publicação em: 20/6/2010. Revisto em: 1/12/2010. Aceito em: 23/10/2011.

¹ Setor de Parasitologia. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

Sul State, Brazil. For Kazacos and Faust et al. methods, Zinc sulphate (d=1.35) was used as flotation solution and in Ruiz et al. method, sucrose solution (d=1.2g/ml). Fifty replicated examinations were performed for each type of flotation method. The results were expressed as the number of *T. canis* eggs recorded and/or percentage rates of recovery in sand samples. Our findings include the presence of 7/50 (14%) samples with *Toxocara* spp eggs; and 1/50 (2%) sample with Ancylostomidae-like eggs. The Kazacos method (30g) detected four (4/7) positive samples; Faust et al. (30g) detected two (2/7) positive samples, Faust et al. (6g) detected one (1/7) positive sample, and the Ruiz et al. method detected two (2/7) positive samples. These data showed no differences between the flotation methods used in this study for *Toxocara* eggs recovery.

KEY WORDS: Flotation methods. Sand. Helminthes. *Toxocara* spp. Eggs. Ancilostomid-like eggs. Public health. Zoonosis.

INTRODUÇÃO

O ciclo evolutivo da maioria dos helmintos parasitos apresenta um padrão comum, pois são eliminados para o exterior, junto com as fezes, estádios que irão constituir as formas infectantes, provocando, assim, a contaminação do solo e sua disseminação no ambiente (19). A deposição dos dejetos animais e humanos é um problema de saúde pública que ainda deve ser avaliado e controlado. A possibilidade de contaminação por dejetos humanos na zona urbana já está controlada em maior ou menor grau pela infraestrutura dos serviços de água e esgoto, entretanto a contaminação ocasionada por fezes de animais, especialmente domésticos, ainda persiste e está diretamente relacionada aos hábitos culturais da população (21, 22).

Esta estreita relação com o ambiente faz com que os geohelmintos tenham um impacto patogênico importante tanto sobre o ser humano quanto sobre os animais (14,15, 20, 23). Sua elevada prevalência no território brasileiro pode ser explicada pelas condições ecológicas favoráveis ao desenvolvimento do ciclo biológico destes patógenos e pelas condições socioeconômicas da população (10).

As parasitoses de caráter zoonótico são transmitidas ao homem pelo contato direto com animais, pela ingestão de estágios transmissíveis existentes no ambiente (cistos, oocistos, ovos e estádios larvais), assim como pela ingestão de hortaliças cruas e de carne crua ou malcozida contendo estádios teciduais infectantes (8, 24, 28, 32). O estabelecimento dessas infecções depende da presença simultânea, no espaço e no tempo, dos componentes da cadeia epidemiológica, da presença do parasito em número suficiente para atingir o hospedeiro, de hospedeiros suscetíveis em grande densidade e de condições ambientais (temperatura, umidade, altitude, tipo de solo) propícias para a transmissão (3, 7, 13, 18, 19, 22, 23, 27).

Dessa forma, a recuperação de ovos do ambiente é importante para que se estabeleça o risco potencial desses parasitos para a população. Entre as pesquisas realizadas para comparar técnicas utilizadas no diagnóstico de parasitos em amostras de solo, um estudo realizado em 1990 avaliou a eficiência e a adequação

em rotina de laboratório de 11 técnicas para a recuperação de ovos de helmintos em amostras de areia e solo. Os testes foram realizados sob condições padronizadas de amostras de areia de 100g, contaminadas experimentalmente com 10, 100 e 1.000 ovos de *Toxocara canis*. Os melhores resultados foram obtidos pelos métodos de sedimentação-flutuação e de peneiragem que apresentaram taxas de recuperação de 43,1% e 41,4%, respectivamente. Em todos os outros métodos testados, as taxas foram de aproximadamente 20% (16).

Em outro trabalho foi avaliada a eficiência de seis métodos para a recuperação de ovos de *T. canis* em amostras de 50g de areia contaminada em condições de laboratório com 10, 100 e 500 ovos; neste caso, o método de Dunsmore et al. (1984), que utiliza solução de NaNO3 (d(densidade)=1,22), foi o que apresentou melhor desempenho (26).

A comparação entre os métodos de centrífugo-flutuação, utilizando-se Sheather (d=1,26) e nitrato de sódio (d=1,35), foi realizada para a recuperação de ovos e larvas de helmintos e oocistos de protozoários do solo, não sendo observadas diferenças significativas na positividade das amostras, com recuperação entre 32,1% e 37,5%, respectivamente (37).

Mentz et al. (2004), utilizando o método de Faust et al. (1938), modificado pelo aumento na densidade de sulfato de zinco de d=1,33 para d=1,35, encontraram uma taxa de 77,7% de recuperação de ovos de *Toxocara* spp em caixas de areia de parques públicos.

Santarém et al. (2009) verificaram ainda a influência de soluções de cloreto de sódio, sulfato de zinco, dicromato de sódio, sulfato de magnésio e nitrato de sódio (d=1,20) e variáveis como tipo de lavagem, tempo, ressuspensão do sedimento, entre outras, em ensaios realizados sob condições de laboratório, e observaram que a solução contendo sulfato de zinco foi a mais eficiente na recuperação de ovos do parasito.

Xavier et al. (2010) utilizaram soluções de sulfato de zinco e nitrato de sódio (d=1,20) em método de centrífugo-flutuação para a recuperação de ovos de solo contaminado em laboratório e demonstraram que o sulfato de zinco recuperou ovos de *T. canis* de amostras com um simples ovo.

Nunes et al. (1994) avaliaram a influência da textura do solo na recuperação de ovos de *T. canis* com o método de centrífugo-flutuação de Dada (Dada, 1979) em solução de flutuação de sulfato de zinco (d= 1,20) e dicromato de sódio (d=1,35). Verificaram uma diferença estatisticamente significativa nos resultados dependendo do tipo de solo (62,5% para a areia e 38,0% para o solo arenoso) e a solução de dicromato de sódio foi mais eficiente.

Considerando a dificuldade na padronização de métodos utilizados para análise de amostras ambientais (16, 25, 26, 27, 31, 37), este estudo teve por objetivo comparar diferentes métodos de centrífugo-flutuação utilizados na rotina de laboratório quanto à eficiência na recuperação de ovos de helmintos em amostras de areia do ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de areia foram realizadas aleatoriamente em 50 pontos, na zona sul, próximo ao estuário do Guaíba, no município de Porto Alegre (30°05'S, 51°10'W, altitude 3m), RS, Brasil, em locais com livre circulação de cães e gatos e presença de fezes de animais. A coleta de cada uma das amostras foi realizada em um quadrante de 2 metros de lado, definido pela presença de fezes, no qual foram coletadas cinco subamostras de 50g de areia em cada um dos quatro vértices e no centro, por raspagem superficial e a 5cm de profundidade, perfazendo uma amostra de 250g. Repetiu-se o processo até chegar a um número de 50 amostras.

Cada uma dessas amostras foi homogeneizada, acondicionada em saco plástico, identificada, transportada em caixa de isopor para o Setor de Parasitologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantida sob refrigeração até seu processamento.

Para a recuperação de ovos de helmintos, utilizaram-se os seguintes métodos que foram comparados entre si: Faust et al. modificado em laboratório e adaptado para pesquisa de ovos de helmintos em areia segundo Mentz et al., utilizando-se amostras de 6g e 30g de areia de modo que fosse aumentada a possibilidade de serem achadas estruturas parasitárias na amostra; Kazacos modificado em laboratório, com 30g de areia, e Ruiz et al., com 10g de areia. Ao todo, foram processadas 50 amostras e todas foram submetidas, em duplicata, a cada um dos métodos acima, perfazendo um total de 400 tubos analisados.

Para o controle positivo, foram utilizadas dez amostras de 250g de areia previamente esterilizada e experimentalmente contaminada com ovos provenientes da coleção helmintológica do laboratório de Parasitologia e conservados em formol a 10%. O inóculo, contendo em média 100 ovos quantificados em câmara de Fuchs-Rosenthal, foi adicionado à amostra. Este material também foi submetido aos métodos acima, em duplicata, perfazendo um total de 80 tubos analisados.

O processamento das amostras de 6g e 30g de areia pelo método de Faust et al. sofreu modificação na densidade da solução de sulfato de zinco que aumentou de d=1,33 para d=1,35 (20).

Repetiu-se no método de Kazacos com a modificação de densidade como descrito acima. O método de Ruiz et al. foi realizado conforme consta na literatura (29).

Os ovos encontrados foram mensurados utilizando-se lente ocular micrométrica e comparados morfologicamente com ovos de *Toxocara* e ancilostomídeos provenientes da coleção helmintológica do laboratório de Parasitologia e mantidos sob conservação em formol a 10%. Os resultados foram expressos em número e/ou percentual de amostras positivas e de recuperação de ovos entre os métodos utilizados.

RESULTADOS

Do total de 50 amostras de areia coletadas e processadas em duplicata pelas técnicas acima mencionadas, 7/50 (14%) foram positivas para ovos de *Toxocara* spp. e somente uma delas apresentou também ovos de ancilostomídeos, ficando assim distribuídas: Faust et al. (6g), 2/7 foram positivas para *Toxocara* spp.; Faust et al. (30g), 1/7 foi positiva para *Toxocara* spp; Kazacos, 4/7 apresentaram *Toxocara* spp. e Ruiz et al., 2/7 evidenciaram *Toxocara* spp. e uma amostra também apresentou ovos de ancilostomídeos. Nas amostras utilizadas como controle, o percentual de recuperação de parasitos foi de 100,0% (10/10) pelo método de Faust et al. com amostras de 6g e 30g e de 80% (8/10), pelos métodos de Kazacos e Ruiz et al. (Figura 1).

Em várias amostras de areia, também foram recuperados ácaros e larvas de nematódeos de vida livre, grãos de pólen e esporos vegetais.

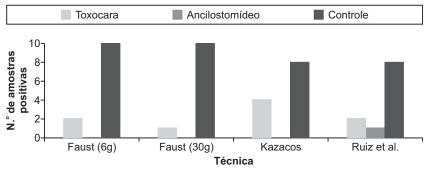


Figura 1. Comparação entre métodos de centrífugo-flutuação na recuperação de amostras de areia positivas para diferentes elementos parasitários no município de Porto Alegre, RS, Brasil.

DISCUSSÃO

Pesquisadores que têm se dedicado ao estudo da contaminação de praias, parques e praças públicas por formas parasitárias potencialmente infectantes para o ser humano em diversas localidades do Brasil (2, 3, 6, 8, 14, 19, 21, 25, 37) e do mundo (1, 5, 7, 13, 15, 18, 22, 29, 30, 33, 34) adotaram métodos bastante diversos para a recuperação de elementos parasitários em amostras de solo.

De modo geral, tais trabalhos apontam elevados índices de contaminação, seja das amostras de fezes ou de solo. Entretanto, diferenças observadas entre os resultados apresentados podem ser atribuídas não apenas às condições ambientais e epidemiológicas diferenciadas, mas também à diversidade dos métodos empregados. Oge & Oge também sugerem que as limitações físicas dos métodos de

isolamento influenciam na recuperação dos ovos de helmintos e, consequentemente, na interpretação desses resultados em termos de saúde pública. Nunes et al. (1994) ressaltam a influência da textura do solo, mostrando que solos ricos em areia possuem maior capacidade de recuperação de ovos (62,5% para a areia e 38,0% para o solo arenoso).

Alguns dos métodos mais utilizados já foram comparados quanto à sua eficiência de recuperação, como os desenvolvidas por Caldwell & Caldwell, Willis e Faust et al. comparados por Mentz et al., e os métodos de Dada, Quinn et al. e Kazacos comparados por Oge & Oge.

No presente estudo, ovos de *Toxocara* spp. e de ancilostomídeos foram os únicos elementos recuperados por todos os métodos estudados.

Dentre os métodos de recuperação de parasitos em amostras de areia coletadas do ambiente, aquele que apresentou maior número de resultados positivos foi o de Kazacos, responsável pela recuperação de ovos de helmintos em quatro das sete amostras positivas. No método de Ruiz et al. foram recuperados 3/7 e no de Faust et al., utilizando-se amostras de 6g, foram 2/7. Por outro lado, o método de Ruiz et al. recuperou uma maior diversidade de parasitos. O método de Faust et al. modificado, quando adaptado ao processamento de 30g de areia, mostrou-se menos eficiente, sendo responsável por apenas uma das sete amostras positivas.

A adaptação do método de Faust et al. modificado por Mentz et al. para utilização de amostras de 30g de areia seguiu indicação de Kazacos. O autor determinou 30g como um tamanho amostral ótimo, enquanto Oge & Oge sugerem a utilização de amostras de 50g de areia. No presente estudo, amostras de 30g foram utilizadas, uma vez que representam o máximo que poderia efetivamente ser processado em todas as etapas pelos métodos de rotina e com os equipamentos disponíveis. É aceito que o incremento no tamanho da amostra analisada aumenta a probabilidade de recuperação de elementos parasitários do solo, especialmente ovos ou oocistos que ocorrem em baixa densidade (16, 25, 26). Isso, entretanto, não foi verificado no presente estudo, pois o mesmo método (Faust et al.) mostrou-se mais eficiente quando utilizou menor quantidade de areia (6g).

Kazacos (1983) comparou diferentes métodos, cuja variável, entre outras, era o tipo de solução de flutuação. Embora o melhor método proposto pelo autor utilizasse solução de nitrato de sódio (NaNO₃), recuperando maior número de ovos em menos tempo, os resultados obtidos por ele não indicaram diferença significativa entre esta e a solução de sulfato de zinco. Isso corrobora os registros feitos por Santarém et al. (2009) que, ao estudarem a influência de soluções em ensaios realizados sob condições de um grama de amostras de solo previamente esterilizadas e contaminadas com 200 ovos de *T. canis*, verificaram que a solução contendo sulfato de zinco foi a mais eficiente na recuperação de ovos do parasito. O mesmo foi encontrado por Xavier et al. (2010) que utilizaram soluções de sulfato de zinco e nitrato de sódio (d=1,20) em método de centrífugo-flutuação para a recuperação de ovos de solo contaminado em laboratório com inóculo de 1, 10,

25, 50, 100 e 200 ovos de *Toxocara canis*, demonstrando que o sulfato de zinco recuperou ovos de amostras com um simples ovo.

Já o método de Ruiz et al.(1973), cuja metodologia é baseada na centrífugo-flutuação em solução de Sheater, é aplicável para diagnóstico laboratorial como forma de avaliação complementar, como já ressaltado por Zandona et al. (2003).

De maneira geral, é a densidade de ovos no solo o fator limitante da efetividade e validade dos testes utilizados na sua recuperação (16, 17, 20). Isso foi constatado no presente estudo com o controle positivo, que obteve, em todos os métodos utilizados, um percentual entre 80% e 100% de recuperação dos ovos de helmintos (Figura 1), diante do percentual de 14% das amostras coletadas no ambiente.

Os métodos utilizados neste estudo são simples e envolvem o uso de materiais de baixo custo e amplamente disponíveis, portanto podem ser utilizados na rotina de laboratório. Métodos com essas características são apontados por diferentes autores (16, 17, 19, 25, 27, 36, 37) como preferíveis em relação a outros que, embora eventualmente se revelem melhores, envolvam equipamentos de custo elevado e/ ou consumam muito tempo em sua realização, o que dificulta sua adoção na rotina.

REFERÊNCIAS

- Antolová D, Reiterová K, Miterpáková M, Stanko M, Dubinský P. Circulation of Toxocara spp. in suburban and rural ecosystems in the Slovak Republic. *Vet Parasitol* 15: 317-324, 2004.
- Araújo FR, Crocci AJ, Rodrigues RGC, Avalhães JS, Miyoshi MI, Salgado FP, Silva MA, Pereira ML. Contaminação de praças públicas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil por ovos de Toxocara e Ancylostoma em fezes de cães. Rev Soc Bras Med Trop 32: 581-583, 1999.
- Araújo FR, Araújo CP, Werneck MR, Górski A. Larva migrans cutânea em crianças de uma escola em área do Centro-Oeste do Brasil. Rev Saude Publica 34: 84-85, 2000.
- Caldwell FC, Caldwell EL. A dilution flotation technique for counting hookworm ova in field surveys. Am J Hyg 6: 146-159, 1926.
- Castillo Y, Bazan H, Alvarado D, Saez G. Estudio epidemiológico de Toxocara canis em parques recreacionales del distrito de San Juan de Lurigancho, Lima – Perú. Parasitol Dia 25: 109-114, 2001.
- Chieffi PP, Müller EE. 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. *Rev Saude Publica 10*: 367-372, 1976.
- Chiodo P, Basualdo J, Ciarmela L, Pezzani B, Apezteguía M, Minvielle M. Related factors to human toxocariasis in a rural community of Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz 101*: 397-400, 2006.
- Colli CM, Rubinsky-Elefant G, Paludo ML, Falavigna DL, Guilherme EV, Mattia S, Araújo SM, Ferreira EC, Previdelli IT, Falavigna-Guilherme AL. Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of south Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 52: 69-74, 2010.
- Dada BJO. A new technique for the recovery of *Toxocara* eggs from soil. *J Helminthol* 53: 141-144, 1979.
- 10. Dias LCS. Geohelmintiasis en Brasil. Bol Chil Parasitol 36: 27-28, 1981.
- 11. Dunsmore JD, Thompson RCA, Bates JÁ. Prevalence and survival of Toxocara canis eggs in the urban environment of Perth, Australia. *Vet Parasitol* 16: 303-311, 1984.
- Faust EC, D'Antoni JS, Odom V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker H. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *Am J Trop Med 18*: 169-183, 1938.
- Fillaux J, Santillan G, Magnaval JF, Jensen O, Larrieu E, Sobrino-Becaria CD. Epidemiology of toxocariasis in a steppe environment: the Patagonia study. Am J Trop Med Hyg 76: 1144-1147, 2007.

- 14. Fortes E, Hoffmann RP, Linadarkis MPB, Camino MMP. Avaliação da contaminação do solo de logradouros públicos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, por ovos de *Toxocara* spp. e sua prevalência em cães que transitam por esses locais. *Rev Bras Med Vet 14*: 34-38, 1992.
- Habluetzel A, Traldi G, Ruggieri S, Attili AR, Scuppa P, Marchetti R, Menghini G, Esposito F. An
 estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of
 human infection in the Marche region of Italy. *Vet Parasitol* 113: 243-252, 2003.
- Horn K, Schnieder T, Stoye M. Quantitative comparison of different methods for the detection of Toxocara canis eggs in sand samples. Zentralbl Veterinarmed B 37: 241-250, 1990.
- Kazacos KR. Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies. Am J Vet Res 44: 896-900, 1983.
- Lescano SAZ, Chieffi PP, Peres BA, Peres BA, Mello EO, Velarde CN, Salinas AA, Rojas CE. Soil contamination and human infection by *Toxocara* sp. in the urban area of Lima, Perú. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 733-734, 1998.
- Matesco VC, Mentz MB, Rott MB, Silveira CO. Contaminação sazonal por ovos de helmintos na praia de Ipanema, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Patol Trop 35: 135-141, 2006.
- Maśnik E. Relationships between the prevalence of Toxocara eggs in dogs' faeces and soil. Wiad Parazytol 46: 239-244, 2000.
- Mentz MB, Rott MB, Jacobsen SIV, Baldo G, Rodrigues-Júnior V. Frequência de ovos de *Toxocara* spp. em três parques públicos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Patol Trop* 33: 105-112, 2004.
- Milano AMF, Oscherov EB. Contaminación por parásitos caninos de importancia zoonótica en playas de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Parasitol Latinoam* 57: 119-123, 2002.
- Mizgajska H. The role of some environmental factors in the contamination of soil with *Toxocara* spp. and other geohelminth eggs. *Parasitol Int* 46: 67-72, 1997.
- 24. Neves DP. Parasitologia humana. 11 ed. São Paulo; Editora Atheneu; 2005. p.494.
- Nunes CM, Sinhorini IL, Ogassawara S. Influence of soil texture in the recovery of *Toxocara canis* eggs by a flotation method. *Vet Parasitol* 53: 269-274, 1994.
- Oge H, Oge S. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. *Vet Parasitol* 92: 75-79, 2000.
- 27. Quinn R, Smith HV, Bruce RG, Girdwood RWA. Studies on the incidence of *Toxocara* and *Toxascaris* spp. ova in the environment. 1. A comparison of flotation procedures for recovering *Toxocara* spp. ova from soil. *J Hyg (Lond)* 84: 83-89,1980.
- 28. Rey L. Bases da parasitologia médica. 3 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2010. p. 391.
- 29. Ruiz A, Frenkel JK, Cerdas L. Isolation of Toxoplasma from soil. J Parasitol 59: 204-206, 1973.
- Salinas P, Matamala M, Schenone H. Prevalencia de hallazgo de huevos de *Toxocara canis* em plazas de la Región Metropolitana de la ciudad de Santiago, Chile. *Bol Chil Parasitol* 57: 102-105, 2001.
- Santarém VA, Magoti LP, Sichieri TD. Influence of variables on centrifuge-flotation technique for recovery of Toxocara canis eggs from soil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 51: 163-167, 2009.
- Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol 30: 1379-1393, 2000.
- Sommerfelt I, Degregorio O, Barrera M, Gallo G. Presencia de huevos de *Toxocara* spp. en paseos públicos de la ciudad de Buenos Aires, Argentina, 1989-1990. Rev Med Vet (B Aires) 73: 70-74, 1992.
- Tsuji OV, Hernández R, Barbabosa AM, Marin IM, Narciso P, Zavala JT, Torres PA. Contaminación de suelos por huevos de *Toxocara* sp. en parques públicos y jardines de casas-habitación de la ciudad de México. *Bol Chil Parasitol* 51: 54-58, 1996.
- Willis HH. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. Med J Aust 29: 375-376, 1921.
- Xavier RIG, Ramos BC, Santarém VA. Recovery threshold of Toxocara canis eggs from soil. Vet Parasitol 167: 77-80, 2010.
- Zandona MR, Spalding SM, Bastiani M, Ferreira JRD, Sopelsa AI, Myllius LC. Comparação entre técnicas laboratoriais de recuperação de estruturas parasitárias no solo. In: Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia, Rio de Janeiro, RJ. p. 65, 2003.