

COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS NO DIAGNÓSTICO DE PARASITOS EM CÃES

João Lucas de Freitas Silva¹, Rodrigo Rodrigues Cambraia de Miranda², Wellington Barbosa de Paiva³, Lara Cardoso Rabello⁴, Mariana de Magalhães Maximiano⁵, Paulo Vitor Alves Ribeiro⁶, Natália Berne Pinheiro⁷

1 João Lucas de Freitas Silva, Ciências biológicas, Universidade Federal Uberlândia, campus Uberlândia, Uberlândia-MG, joaolucas2876@yahoo.com

2 Rodrigo Rodrigues Cambraia de Miranda, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

3 Wellington Barbosa de Paiva, Ciências biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

4 Lara Cardoso Rabello, Ciência biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

5 Mariana de Magalhães Maximiano, Ciências biológicas, Universidade Federal Uberlândia, Uberlândia-MG.

6 Paulo Vitor Alves Ribeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

7 Orientador: Natália Berne Pinheiro da Universidade Federal de Uberlândia, campus Uberlândia Uberlândia-MG, nbernevet@gmail.com

RESUMO

Os parasitos encontrados em cães, quando não tratados, podem trazer problemas para a saúde pública, pelo fácil acesso dos mesmos a outros animais e pela proximidade com os seres humanos. Além de helmintos e protozoários infectarem cães, podem atuar como agente patogênicos para humanos, a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados ou infecções percutâneas. Com isso é indispensável o diagnóstico destas doenças em animais de companhia para a sua prevenção e o seu combate e a escolha do método diagnóstico pode definir o sucesso destas estratégias. O presente trabalho tem como finalidade apresentar os procedimentos e resultados dos testes para detecção de ovos, cistos e oocistos de parasitos em cães, tanto em filhotes quanto em adultos a partir de amostras de fezes. Os testes foram realizados a partir das técnicas mais utilizadas como: McMaster (MC) (Gordon & Whitlock, 1939), uma técnica quantitativa e qualitativa; a técnica descrita por Faust et al., 1938 (FT), que utiliza como princípio a centrífugo-flutuação e a técnica de Willis, 1927 (WL), que tem como princípio a flutuação. Durante o estudo foram coletadas treze amostras de cães em um abrigo que recolhe animais não domiciliados de várias regiões da cidade de Uberlândia-MG. Nestas amostras foram identificados os nematódeos, *Toxocara* spp. e *Ancylostoma* spp. e os protozoários, *Cystoisospora* spp. e *Giardia* spp. Onze amostras foram positivas para algum parasito pela técnica de WL, sete foram positivas pela técnica de MC e nove foram positivas pela técnica de FT. A técnica de FT foi a mais sensível para os parasitos *Toxocara* spp. e *Giardia* spp., e a técnica de WL para *Cystoisospora* spp., e *Ancylostoma* spp. A partir dos resultados desse estudo foi possível inferir que é imprescindível a escolha correta do método de diagnóstico coproparasitológico para helmintos e protozoários de cães, e quando possível, utilizar mais de uma técnica de forma complementar.

INTRODUÇÃO:

As parasitoses transmitidas por cães representam um grande problema em saúde pública. O fácil acesso de cães errantes a ambientes públicos de lazer como praças e parques, e a proximidade destes animais com o ser humano torna mais relevante a presença de infecções (Deplazes et al., 2011).

Ancylostoma spp, *Toxocara* spp, *Cystoisospora* spp, *Giardia* spp, são alguns parasitos do sistema gastrointestinal que podem infectar cães. Os parasitos do gênero *Ancylostoma* e *Toxocara* pertencem ao filo Nematoda o qual é composto por organismos de corpo cilíndrico, alongados, pseudocelomados, apresentam sistema digestivo completo, são dióicos e as formas adultas possuem dimorfismo sexual. Possuem três estágios evolutivos em seu ciclo de vida: adulto, ovo e larva com quatro estágios larvais. Seus corpos são revestidos por cutícula acelular que é normalmente substituída durante o desenvolvimento larval. Trata-se de

um filo com grande abundância de espécies e diversificação no seu modo de vida, reprodução e transmissão (Neves, 2016).

Além dos cães, o gênero *Ancylostoma* também pode infectar os seres humanos causando a dermatite serpiginosa ou também popularmente chamada de “bicho geográfico”. A infecção pode acontecer pelo do contato da pele com o solo contaminado com as fezes de cães. As larvas desses agentes etiológicos de terceiro estágio (L3) penetram ativamente a pele dos humanos e migram através do tecido subcutâneo. A medida que essas larvas L3 vão progredindo, elas deixam lesões na pele em formas de rastros “curvados”, que posteriormente desaparecem, conhecidos como o “bicho geográfico” ou dermatite pruriginosa. Em alguns casos mais raros podem causar um comprometimento pulmonar (Neves, 2016).

Os filhotes de cães contaminados por esses ancilostomídeos por via transmamária, podem apresentar anemia grave, emagrecimento, perda de apetite, diarreia com sangue. Os cães ou gatos adultos, quando infectados, podem apresentar lesões, irritações na pele do animal nos locais de penetração dessas larvas e inflamações no pulmão.

Os parasitos do gênero podem causar a “síndrome da larva migrans visceral” nos seres humanos. Seus sintomas consistem em febre, anorexia, hepatosplenomegalia, exantema, pneumonite e sintomas asmáticos, dependendo dos órgãos afetados. Os seres humanos podem se contaminar em decorrência da ingestão de ovos larvados de *Toxocara* spp. que vão resultar nas larvas migratórias. Nos cães podem ter a ocorrência de sintomas semelhantes aos dos ancilostomídeos (OVERGAAW & KNAPEN, 2013).

Outro grupo de organismos que podem causar parasitoses nos seres vivos, são os protozoários (microorganismos unicelulares). Um destes, os parasitos do gênero *Cystoisospora*, podem desencadear sintomas como cólicas abdominais, febre, diarreia prolongada, e aumento de gases nos seres humanos infectados. A contaminação pode acontecer pela ingestão de alimentos ou água contaminados por oocistos desses parasitas. No intestino estas formas evolutivas irão se desenvolver em esporocistos. Os sintomas apresentados em cães se dão pela infecção na parede intestinal, causando lesões, diarreia e prejudicando o funcionamento de órgãos do sistema digestório. Nestes animais, a contaminação pode acontecer por ingestão de água, alimentos contaminados ou até outros animais que são capazes de transportar o protozoário, como ratos, baratas e moscas.

Outro protozoário de grande relevância é a *Giardia* spp. e as infecções por esse agente patogênico ocasionam sintomas parecidos com a *Cystoisosporíase* nos seres humanos. A infecção ocorre pela ingestão dos cistos desses organismos que posteriormente evoluem para trofozoítos e se alojam no duodeno por meio de ventosas. A giardíase é uma doença com alta prevalência em cachorros e, quando contaminados, as fezes apresentam-se normalmente diarreicas com um forte odor e um tom esverdeado. Os cães se contaminam por cistos e trofozoítos, através do contato com fezes de outros animais contaminados (Lujan, 2006).

Devido a todos esses fatores, os endoparasitos têm grande importância para a saúde pública, devido ao grande potencial de contaminação para humanos e outros animais. As fezes de cães contaminadas por esses helmintos e protozoários podem estar em diversos locais como praias, praças públicas, parques, caixas de areia em parques infantis, etc. Todos esses locais podem ser focos de infecção para outros animais, para o ser humano, sendo deste grupo as crianças as mais afetadas. Portanto, ter um controle desses parasitos é essencial, para saúde dos cães e dos seres humanos e parte fundamental deste processo é um correto e eficiente diagnóstico. Diversas são as técnicas que podem ser utilizadas para observar a presença de formas parasitárias nos cães, elas diferem em equipamentos necessários, soluções utilizadas e sensibilidade no diagnóstico. As técnicas de McMaster (Gordon & Whitlock, 1939), Faust et al., (1938) e Willis (1927) são baseadas no princípio da flutuação mas podem apresentar resultados diferentes de acordo com os parasitos investigados. Com isso o objetivo deste estudo foi comparar três diferentes técnicas de diagnóstico coproparasitológico em amostras de fezes de cães.

METODOLOGIA:

As amostras de fezes foram coletadas de uma associação que recolhe e abriga animais não domiciliados de todas as regiões da cidade de Uberlândia. Para este estudo foram analisadas 13 amostras de cães, sendo destes 6 jovens e 7 adultos. Para o diagnóstico foram utilizadas três técnicas para o exame parasitológico de fezes para a identificação dos ovos, cistos e oocistos de parasitos. As técnicas utilizadas foram a de McMaster (MC) (Gordon & Whitlock, 1939 - modificada), Faust et al., (FT) (1938) e Willis (WL) (1927).

Para as amostras processadas pela técnica de MC foi utilizado 2g de fezes que foram homogeneizadas e pesadas em uma balança, utilizando um béquer. Em seguida, as fezes foram homogeneizadas com 28 mL de água e filtradas através de um coador com dupla camada de gaze. Logo depois, a suspensão foi homogeneizada e transferida para um tubo de 15 mL e submetida a centrifugação a 1500 g por 3 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o tubo preenchido novamente até o nível anterior com solução hipersaturada (solução saturada de NaCl). Posteriormente, a suspensão foi ressuspendida e a primeira câmara "A" da lâmina de McMaster foi preenchida rapidamente para que não ocorra formação de bolhas. O passo foi repetido na câmara "B". Após dois minutos, a câmara foi observada ao microscópio ótico com as objetivas de 10x e 40x.

A técnica de FT utiliza como princípio a centrífugo-flutuação com sulfato de zinco a 33% e densidade 1,180. Foram utilizadas 3 g de fezes homogeneizadas em água filtrada. Em seguida, a mistura foi filtrada com o auxílio de uma dupla camada de gaze e transferida para um tubo e centrifugada a 3000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e a operação foi repetida até o líquido do sobrenadante ficar claro. Depois, o sedimento foi suspenso novamente com sulfato de zinco até a borda e centrifugado a 1600 g por 3 minutos. Posteriormente, o material da parte superior do tubo foi recolhido com alça de platina e colocado em uma lâmina com 1 gota de lugol e lamínula para examinar no microscópio ótico.

O método de WL tem como princípio a concentração das estruturas parasitárias por flutuação. Para isso, foram misturadas 3g de fezes com 10 mL de solução hiper saturada de cloreto de sódio em um béquer utilizando um bastão de vidro e a solução foi filtrada através de um coador para outro recipiente. Em seguida, o conteúdo filtrado foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e o volume foi completado com solução hiper saturada de cloreto de sódio até a formação de um menisco nas bordas do tubo. Em seguida, adicionou-se a lamínula que permaneceu em contato com o menisco por 15 minutos em repouso, sendo posteriormente invertida rapidamente para a lâmina e examinada ao microscópio ótico com as objetivas de 10X e 40X.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Neste estudo, considerando todas as análises, foram identificados dois nematódeos, *Toxocara* spp. e *Ancylostoma* spp. e dois protozoários, *Cystoisospora* spp. e *Giardia* spp. (Figura 1). Dessas, onze cães foram positivos para algum parasito na técnica de Willis, sete foram positivos pela técnica de McMaster e nove foram positivos pela técnica de Faust.

A técnica de FT foi a mais sensível para os parasitos *Toxocara* spp. e para *Giardia* spp., e WL para *Cystoisospora*, spp. e *Ancylostoma* spp.. Dentre as três técnicas utilizadas WL foi a avaliação que apresentou o menor número de animais falso negativos e MC a que demonstrou a menor sensibilidade com o maior número de animais falso negativo.

A técnica mais sensível para o diagnóstico de protozoários foi a de FT, com quatro animais positivos, seguida por WL, com três animais positivos. Para nematódeos, WL foi a análise que observou o maior número de animais positivos (seis), seguido por FT com apenas 3 animais positivos.

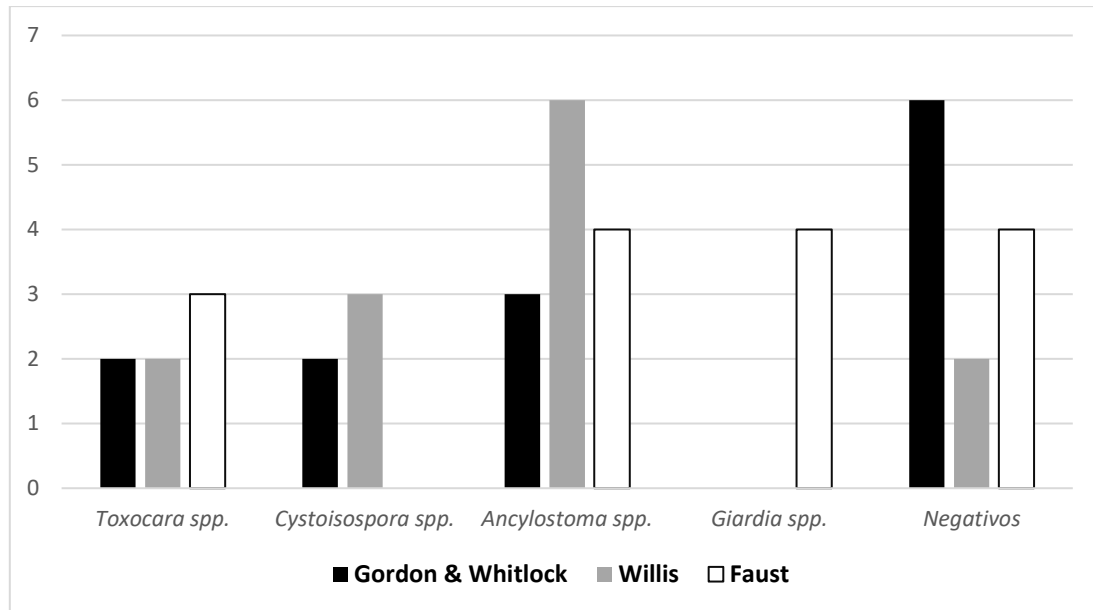


Figura 1: Número de cães diagnosticados com *Toxocara spp.*, *Ancylostoma spp.*, *Cystoisospora spp.* e *Giardia spp.* pelas técnicas de Gordon & Whitlock, Willis e Faust.

Encontrar uma técnica de investigação laboratorial que tenha uma alta especificidade e sensibilidade é de suma importância para resultados confiáveis em pesquisas. O parasito *Toxocara spp.* foi encontrado em amostras utilizando as 3 técnicas: MC, WL e FT, porém a técnica FT se mostrou levemente mais sensível, tendo apontado a presença do parasito em uma amostra onde os demais não apontaram, assim sendo a técnica de FT foi a mais efetiva para a análise deste parasito, como já utilizada em outras pesquisas (ARAÚJO et al. 2020).

Porém para o parasito *Cystoisospora spp.* a técnica de FT não foi tão efetiva, uma vez que não detectou o parasito em nenhuma das amostras analisadas. Entretanto, as técnicas de WL e MC identificaram o protozoário nas amostras fecais, sendo a técnica de WL a mais efetiva, sendo possível observar parasitos em algumas amostras onde, pela técnica de MC, não foram observados. Nesse sentido, a técnica mais indicada para investigar a presença de *Cystoisospora spp.*, de acordo com este estudo, foi a técnica de WL, como já demonstrado em outros estudos (LIMA et al. 2018).

Utilizando-se desta técnica também tivemos um melhor resultado na investigação de *Ancylostoma spp.*. Embora todas as técnicas utilizadas tiveram a capacidade de detectar a existência do parasito em questão, a técnica de WL apresentou melhor sensibilidade para as amostras onde o *Ancylostoma spp.* estava presente, ao contrário das técnicas de MC e FT que tiveram resultado zerado em algumas amostras onde observou-se estes parasitos pela técnica de WL. Corroborando com outros estudos que também utilizaram esta metodologia para identificação de *Ancylostoma spp.* (COELHO et al. 2011).

Em relação ao diagnóstico de *Giardia spp.* não foi possível observá-la utilizando as técnicas de MC e WL. Ambas produziram resultados negativos em amostras fecais positivas para este protozoário. Já quando se utilizou a técnica de FT foi possível encontrar o parasito em quatro amostras diferentes, mostrando que essa análise tem melhores resultados quando se é necessário investigar *Giardia spp.*, confirmando os resultados previamente publicados por Jeske et al., (2018).

CONCLUSÕES:

A metodologia a ser utilizada para o diagnóstico de helmintos e protozoários em cães pode definir o êxito ou a falha no controle e profilaxia dos parasitos e para aumentar acurácia é indicado a utilização de mais de uma técnica de diagnóstico coproparasitológico. Com base nos resultados apresentados, sugere-se que a técnica descrita por Willis (1927) demonstrou o menor número de animais falso negativos e a técnica de Faust et al., (1938) a única a qual foi possível a observação de *Giardia spp.*. Porém é necessário o aumento no número amostral para uma conclusão mais representativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ARAÚJO GMS, WALCHER DL, PREVITALI IF, LEHMAN LM, COSTA MP, SUSIN LO, AVILA LFC, SCAINI CJ. Frequency of enteroparasitic infections and serum positivity for *Toxocara* spp. in children from a public day care center in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, Apr-Jun;80(2):305-310, 2020.
- COELHO WM, AMARANTE AF, APOLINÁRIO JDE C, COELHO NM, BRESCIANI KD. Occurrence of *Ancylostoma* in dogs, cats and public places from Andradina city, São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** Sao Paulo. Jul-Aug;53(4):181-4, 2011.
- DEPLAZES, P., VAN KNAPEN, F., SCHWEIGER, A. & OVERGAAUW, P. A. Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. **Veterinary parasitology**, 182(1), 41-53, 2011.
- FAUST, E. C. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. **American Journal of Tropical Medicine**, 18(2), 169-183, 1938.
- GORDON, H. McL & WHITLOCK, H.V. A new Technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**. 12 (1): 50-52, 1939.
- JESKE S, BIANCHI TF, MOURA MQ, BACCEGA B, PINTO NB, BERNE MEA, VILLELA MM. Intestinal parasites in cancer patients in the South of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, Aug;78(3):574-578. 2018.
- LIMA JAS, REZENDE HHA, ROCHA TMDD, CASTRO AM. Analysis of the accuracy of different laboratory methods for the diagnosis of intestinal parasites from stray and domiciled cats (*Felis catus domesticus*) in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jan-Mar;27(1):95-98, 2018.
- LUJAN, H. D. Giardia y giardiasis. **Medicina** (Buenos Aires), 66(1), 70-74, 2006.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 13ª ed. Atheneu, São Paulo, 524p, 2016.
- OVERGAAUW, P. A. M.; KNAPEN, F. V. Veterinary and public health aspects of *Toxocara*. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 398–403, 2013.
- WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, 8: 375-376, 1927.