

**Avaliação da Contaminação Experimental de Areias de Praias por Enteroparasitas. Pesquisa de Ovos de Helmintos. \***

\* Trabalho vinculado ao Programa de Cooperação Técnica entre a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Companhia Municipal de Limpeza Urbana (Comlurb), Companhia Estadual de Água e Esgoto (Cedae), Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (Feema) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Joaquim Pereira da Silva \*\*  
Mauro Célio de A. Marzochi \*\*  
Elisabeth Cardoso Leal dos Santos \*\*\*

\*\* Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz.

\*\*\* Centro de Pesquisas Aplicadas da Companhia Municipal de Limpeza Urbana/Comlurb, Rio de Janeiro, Brasil.

*Procurou-se avaliar métodos e soluções tradicionalmente utilizados na evidenciação de ovos de helmintos parasitos, de fezes ou do solo, em amostras de areia de praia experimentalmente contaminadas com ovos de Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Toxocara canis e Ancylostoma sp. Das soluções classicamente utilizadas, a de Dicromato de Sódio (d= 1,350) foi a que apresentou melhores resultados (Índice de recuperação = 50%) para ovos de Ascaris, em 24 horas de observação. As duas soluções propostas: Carbonato de Sódio (d= 1,040) e Detergente aniônico sintético - Sulfonato de Sódio (d= 1,040), apresentaram índices de recuperação surpreendentes, superiores a 80% para os ovos de Ascaris, em 24 horas de observação. Conclui-se que o detergente de uso doméstico, pelo seu baixo custo e facilidade de aquisição, pode ser usado na avaliação de rotina da contaminação de areias de praias pelos ovos de enteroparasitos, importantes indicadores de contaminação fecal, necessários a um adequado monitoramento sanitário do meio.*



Como enteroparasitas são considerados tanto os helmintos como os protozoários que habitam o trato intestinal do homem e de animais com potencialidade de causar doenças.

Entre os helmintos parasitas destacam-se, pela elevada prevalência e ampla distribuição, aqueles que dependem do solo para sua transmissão, por isso denominados geohelmintos. A importância destes depende, fundamentalmente, da presença de indivíduos infectados, da contaminação fecal do solo, das condições favoráveis ao desenvolvimento dos estágios infectantes, ovos e larvas, e do contato entre indivíduos sãos e o solo poluído (Camillo-Coura, 1970).

A importância da água na disseminação das enteroparasitoses se deve ao fato de funcionar como um corpo de transporte, por permitir a sobrevivência das formas de resistência dos protozoários parasitas, os cistos, e não prejudicar a viabilidade dos ovos de helmintos veiculados, os quais sofrem um atraso em sua evolução devido às condições de baixa tensão de oxigênio da água, contribuindo para a transmissão em momentos mais oportunos (Belding, 1965).

A contaminação do solo depende do destino dado aos dejetos humanos, relacionada tanto às condições higiênicas individuais e de saneamento da comunidade, como a outros fatores ambientais. O solo, com relação aos helmintos parasitas se comporta como um hospedeiro intermediário. Recebe fezes ou água contaminada por parasitas em estádios não-infectantes, oferecendo-lhes condições para o desenvolvimento, e protege os parasitas em estádios infectantes durante certo tempo para, posteriormente, transmiti-lo ao homem (Viña, 1965).

O desenvolvimento dos ovos e o tempo de sobrevivência das larvas dependem de fatores físicos, químicos e biológicos, tais como temperatura, umidade, porosidade, textura e consistência do solo, grau de exposição à luz solar, chuvas, ventos, presença de microorganismos, animais ou vegetais predadores, entre outros.

O *Ascaris lumbricoides* e o *Trichuris trichiura*, helmintos de grande prevalência em nossa população, necessitam que seus ovos tenham um período de incubação no solo para se tornarem infectantes. Esse período está em torno de duas a três semanas. Os ancilostomídeos e o *Strongyloides stercoralis* necessitam que suas larvas sofram várias mudas no solo, em cinco a seis dias, para se tornarem infectantes, aptas a penetrarem ativamente na pele.

Outros ancilostomídeos parasitos de animais (*Ancylostoma brasiliense* e *A. caninum*) e o ascarídeo *Toxocara canis* podem se desenvolver, esporadicamente, no homem, causando infecções abortivas não menos importantes, como as dermatites serpingeantes ou *larvas migrans* cutânea e a *larva migrans* visceral (OMS, 1964).

Entre os alimentos, as hortaliças consumidas cruas têm importante papel na disseminação dos enteroparasitos pelo fato de serem, muitas vezes, irrigadas com águas contaminadas (Marzochi, 1977). Embora, em condições naturais, a persistência de ovos de *Ascariis* sp. na superfície dos vegetais seja menor que no solo, foram encontrados ovos de *Ascaris* sp. viáveis em vegetais conservados em salmoura (Belding, 1965).

A contaminação das praias balneárias do Rio de Janeiro por dejetos humanos e animais vem se consti-

tuindo em um sério problema estético-sanitário. A padronização de métodos práticos e sensíveis, disponíveis em qualquer laboratório de controle sanitário de rotina, torna-se imperativa para a avaliação da contaminação das areias.

As técnicas de evidenciação de ovos de helmintos, tanto de fezes humanas quanto de animais, se baseiam na capacidade de flutuação dos mesmos quando submetidos a líquidos com densidade superior a da água ( $d=1,0$ ), ou na capacidade de sedimentação daqueles ovos mais pesados em água pura.

A partir do solo, devido à existência de excesso de elementos particulados indesejáveis, os ovos são mais bem recuperados, quando submetidos a líquidos densos.

Vários autores têm preconizado diferentes soluções para a pesquisa de ovos de helmintos do solo, sendo raras, contudo, referências relativas a areias de praias marinhas. Em vista disso, propusemo-nos a desenvolver metodologias alternativas práticas que facilitem o exame de rotina das areias e capazes de satisfazer a critérios satisfatórios de especificidade e sensibilidade. No presente trabalho, objetivamos avaliar experimentalmente os métodos e soluções tradicionalmente utilizados para exame do solo, quando aplicados em areias de praia e comparar com outras soluções ainda não testadas para este fim.

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras com 20g de areia de praia, previamente esterilizadas em forno Pasteur a 120°C por duas horas, foram experimentalmente contaminadas com números conhecidos de ovos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e de ancilostomídeos, isolados previamente de fezes humanas e *Toxocara canis*, isolados de fezes de cão e conservados em solução preservativa.

As amostras foram submetidas a dessecação em estufa microbiológica a uma temperatura de + 32°C, por um período de duas semanas.

Cada cinco conjuntos de três amostras foram colocados em *beckers* de 250ml e o volume total completado com 30ml da solução ensaiada e examinados em triplicata nos intervalos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas.

Foram testadas as seguintes soluções e respectivas densidades, conforme o preconizado por diversos autores para a evidenciação de ovos de helmintos de fezes ou do solo, incluindo o Fosfato Trissódico preconizado por Callen & Cameron (1960) para rehidratação de fezes mumificadas (coprólitos) para a pesquisa de ovos e larvas de helmintos:

Carbonato de Potássio	(d= 1,450)	Nemeseri & Hollo (1961)
Hipoclorito de Sódio	(d= 1,410)	Caldwell & Caldwell (1928)
Dicromato de Sódio	(d= 1,350)	Cort et al. (1929)
Sulfato de Magnésio	(d= 1,250)	Nemeseri & Hollo (1961)
Sacarose	(d= 1,235)	Caldwell & Caldwell (1928)
Glicerol	(d= 1,225)	Nemeseri & Hollo (1961)
Fosfato Trissódico	(d= 1,200)	Callen & Cameron (1960)
Cloreto de Sódio	(d= 1,200)	Beaver (1952)
Sulfato de Zinco	(d= 1,180)	Faust et al. (1938)
Hidróxido de Sódio	(d= 1,030)	Berlinguer (1960)

Para estudo comparativo, ensaiamos outras duas soluções ainda não referidas para a pesquisa de ovos de helmintos em solo ou areia.

Carbonato de Sódio	(d= 1,040)	Ruffer (1910)
Detergente aniônico sintético	(d= 1,040)	

O exame se constituiu na transferência do líquido sobrenadante de cada *becker*, após a agitação prévia e repouso nos tempos determinados, para tubos de centrífuga clínica e centrifugado a 2.000 rpm. durante dois minutos. Todos os três sedimentos de + 0,05ml, foram transferidos para lâminas de microscopia, cobertos com lamínulas 24 x 32mm e os ovos contados sob objetiva de 40X em todos os campos microscópicos.

Paralelamente, amostras de terra colhidas do solo do Campus da Fiocruz foram submetidas aos mesmos procedimentos e testadas com algumas das soluções, incluindo-se as duas em avaliação.

## RESULTADOS

A maioria das soluções propostas para a recuperação de ovos de enteroparasitas de fezes e/ou solo não se mostraram eficientes, quando aplicadas em amostras de areia de praia, experimentalmente contaminadas e submetidas à dessecação.

Das soluções tradicionalmente utilizadas, a de Dicromato de Sódio (d= 1,350), proposta por Cort et al. (1929) para exame do solo, foi a que apresentou melhores resultados em areia.

Resultados surpreendentes, no entanto, foram obtidos com a solução alcoólica de Ruffer (1910), originalmente proposta para a rehidratação de tecidos mumificados para estudos histopatológicos: Etanol GL-30ml, Água-50ml e Carbonato de Sódio a 5%-20ml (d= 1,040) e com soluções de detergentes sintéticos aniônicos de uso doméstico; alquil-benzeno-sulfonato

de sódio e alquil sulfato de sódio, por nós ensaiados, corrigidos para a densidade de 1,040.

O Carbonato de Sódio, quando comparado com a solução de Dicromato de Sódio, mostra resultados superiores, para *A. lumbricoides*, com índice de recuperação 1,58 vezes maior nos exames de 24 horas (Tabela I). Com relação aos outros helmintos, a condução fica prejudicada pelo pequeno número de ovos testados.

Os testes com a solução de Carbonato de Sódio e com detergentes líquidos, quando comparados entre si, mostraram performances idênticas, com índices de recuperação superiores a 80% para *A. lumbricoides*, nas observações de 24 horas (Tabela II).

O melhor tempo de observação foi, portanto, de 24 horas, para as principais soluções testadas, sendo que os ovos de helmintos *Ascaris*, *Trichuris* e *Toxocara* apresentavam-se morfológicamente inalterados, estando ainda em curso o estudo da viabilidade dos mesmos. Os ovos de ancilostomídeos não foram recuperados.

Em amostras de terra, entre algumas soluções classicamente utilizadas, a de Dicromato de Sódio logrou melhores resultados. Os índices de recuperação obtidos com as soluções de Carbonato de Sódio e de Detergente foram decepcionantes.

## DISCUSSÃO

Amostras de areia de praia contaminadas experimentalmente e submetidas a dessecação constituíram-se em bom modelo para o estudo de diversas soluções testadas na flutuação e recuperação de ovos de helmintos parasitas.

Das soluções tradicionalmente utilizadas por diversos autores para a recuperação de ovos de enteroparasitas do solo, o Dicromato de Sódio ( $d = 1,350$ ) apresentou índice de recuperação de 50% para ovos de *Ascaris*, após 24 horas de observação.

Das novas soluções ensaiadas, o Carbonato de Sódio ( $d = 1,040$ ), originariamente proposto por Ruffer (1910) para a rehidratação de tecidos mumificados, prestou-se otimamente para fazer flutuar os ovos de *Ascaris*. Este efeito, no entanto, não foi observado com a solução de Fosfato Tridissódico, originalmente preconizado por Callen & Cameron (1960) para a rehidratação de ovos e larvas de helmintos mumificados em coprólitos.

Também se destacaram as soluções tensoativas aniônicas sintéticas (detergentes domésticos), com densidade de 1,040, cujas eficiências foram semelhantes ao Carbonato de Sódio, com a vantagem de serem de baixo custo e facilmente encontradas no comércio.

TABELA I

Recuperação de ovos de helmintos em amostras de areia de praia experimentalmente contaminadas com número conhecido de ovos \*, conforme soluções utilizadas (Carbonato de Sódio e Dicromato de Sódio) e o tempo de avaliação

Tempo de Observação	Soluções	Ovos de helmintos	Contagem			Média	Índice de Recuperação (%)
			1º	2º	3º		
3 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	40	38	39	39,0	47,6 **
		<u>T.trichiura</u>	2	1	2	1,7	24,3
		<u>Toxocara canis</u>	1	1	1	1,0	50,0
	Dicromato de Sódio (d= 1,350)	<u>A.lumbricoides</u>	17	21	19	19,0	23,2
		<u>T.trichiura</u>	1	0	1	0,7	10,0
		<u>Toxocara canis</u>	0	0	0	0	0
6 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoide</u>	45	42	43	43,3	52,8 **
		<u>T.trichiura</u>	2	1	2	1,7	24,3
		<u>Toxocara canis</u>	1	1	1	1,0	50,0
	Dicromato de Sódio (d= 1,350)	<u>A.lumbricoides</u>	8	10	9	9,0	11,0
		<u>T.trichiura</u>	1	1	1	1,0	14,3
		<u>Toxocara canis</u>	0	0	0	0	0
12 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	48	41	44	44,3	54,0 **
		<u>T.trichiura</u>	3	2	3	2,7	38,6
		<u>Toxocara canis</u>	2	1	1	1,3	65,0
	Dicromato de Sódio (d= 1,350)	<u>A.lumbricoides</u>	15	17	19	17,0	20,7
		<u>T.trichiura</u>	1	0	1	0,7	10,0
		<u>Toxocara canis</u>	0	0	0	0	0
24 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	62	71	60	64,3	78,4 **
		<u>T.trichiura</u>	4	3	3	3,3	47,1
		<u>Toxocara canis</u>	2	2	2	2,0	100,0
	Dicromato de Sódio (d= 1,350)	<u>A.lumbricoides</u>	42	42	38	40,7	49,6
		<u>T.trichiura</u>	1	2	1	1,3	18,6
		<u>Toxocara canis</u>	1	0	1	0,7	35,0
48 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	37	39	41	39,0	47,6 **
		<u>T.trichiura</u>	2	2	2	2,0	28,6
		<u>Toxocara canis</u>	0	0	0	0	0
	Dicromato de Sódio (d= 1,350)	<u>A.lumbricoides</u>	24	29	21	24,7	30,1
		<u>T.trichiura</u>	3	4	3	3,3	47,1
		<u>Toxocara canis</u>	0	0	0	0	0

(\*) Em cada amostra foram inoculados, em média, 82 ovos de *Ascaris lumbricoides*, sete de *T. trichiura*, dois de *Toxocara canis* e 13 de *Ancilostomidae*.

(\*\*)  $\chi^2$  (COCHRAN) = 77,25 (P 0,001) para *A. lumbricoides* e não conclusivo para os demais ovos.

TABELA II

Recuperação de ovos de helmintos em amostras de areia de praia experimentalmente contaminadas com número conhecido de ovos\*, conforme soluções utilizadas (Carbonato de Sódio e Detergente Sintético) e o tempo de avaliação

Tempo de Observação	Soluções	Ovos de helmintos	Contagem			Média	Índice de Recuperação (%)
			1º	2º	3º		
3 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	40	57	52	49,7	40,4
		<u>T.trichiura</u>	0	0	1	0,3	4,3
		<u>Toxocara canis</u>	1	1	1	1,0	33,3
	Detergente Sintético (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	38	65	64	55,6	45,7
		<u>T.trichiura</u>	1	2	1	1,3	18,6
		<u>Toxocara canis</u>	0	1	1	0,6	20,0
6 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	72	76	70	72,7	59,1
		<u>T.trichiura</u>	1	2	2	1,7	24,3
		<u>Toxocara canis</u>	1	1	1	1,0	33,3
	Detergente Sintético (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	83	72	69	74,7	60,7
		<u>T.trichiura</u>	3	2	2	2,3	32,9
		<u>Toxocara canis</u>	1	2	2	1,7	56,7
12 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	106	101	99	102,0	82,9
		<u>T.trichiura</u>	6	4	3	4,3	61,4
		<u>Toxocara canis</u>	2	1	1	1,3	43,3
	Detergente Sintético (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	91	95	90	92,0	74,8
		<u>T.trichiura</u>	4	3	3	3,3	47,1
		<u>Toxocara canis</u>	3	2	2	2,3	76,7
24 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	103	97	116	105,3	85,6
		<u>T.trichiura</u>	2	2	3	2,3	32,9
		<u>Toxocara canis</u>	1	2	1	1,3	43,3
	Detergente Sintético (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	98	109	100	102,3	83,2
		<u>T.trichiura</u>	2	2	1	1,7	24,3
		<u>Toxocara canis</u>	1	0	1	0,7	23,3
48 Horas	Carbonato de Sódio (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	52	54	56	54,0	43,9
		<u>T.trichiura</u>	3	2	3	2,7	38,6
		<u>Toxocara canis</u>	0	0	0	0	0
	Detergente Sintético (d= 1,040)	<u>A.lumbricoides</u>	54	51	53	52,7	43,0
		<u>T.trichiura</u>	2	1	1	1,3	18,6
		<u>Toxocara canis</u>	0	3	1	1,3	43,3

(\*) Em cada amostra foram inoculados, em média 123 ovos de *A. lumbricoides*, sete ovos de *T. trichiura* e três ovos de *Toxocara canis*.

(\*\*)  $\chi^2$  (COCHRAN) = Sem diferença significativa entre os métodos.

A não-recuperação dos ovos de ancilostomídeos nos ensaios é explicada pelo prolongado período de manutenção das amostras a elevada temperatura e a dessecação, que foi superior ao período de maturação e eclosão das larvas desses ovos em condições naturais (cinco a seis dias).

Essas mesmas soluções, Carbonato de Sódio e Detergente, no entanto, quando aplicadas a amostras de terra experimentalmente contaminadas, não mostraram resultados encorajadores, cuja avaliação do teste é grandemente dificultada pela presença de partículas coloidais em suspensão, próprias do solo.

Para esta finalidade, está mais indicada a utilização da solução de Dicromato de Sódio (Cort et al., 1929), de Cloro de Sódio (Beaver, 1952; Marzochi, 1970), ou de Hidróxido de Sódio e Sulfato de Zinco (Pinheiro et al., 1977) ao invés da solução de Hipoclorito de Sódio (Caldwell & Caldwell, 1928), que altera e destrói os ovos de várias espécies de helmintos, prejudicando suas identificações.

Cabe ressaltar que a presença de enteroparasitas no solo, na água ou em alimentos, além de sua importância específica, é um importante indicador biológico de contaminação fecal, servindo de alerta para a transmissão de outros agentes como os enterovírus, o vírus da hepatite A e as enterobactérias, com repercussões mais importantes sobre o organismo humano. Além disso, os ovos dos helmintos parasitas, por serem maiores, mais resistentes e mais fáceis de serem evidenciados no ambiente, fornecem indicação segura da contaminação fecal atual ou recente, podendo constituir-se em coadjuvante necessário a um adequado monitoramento sanitário do meio.

*An attempt was made to assess methods and solutions traditionally used for evidencing the presence of helminth's eggs in faeces or soil from beach sand samples experimentally infected with eggs of *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Toxocara canis* and *Ancylostomidae*. Among classically used solutions, Sodium Dicromate ( $d= 1.350$ ) was the one with better results (recovery rate = 50%) for *Ascaris* eggs in a 24 hours observation. The two suggested solutions — Sodium Carbonate ( $d= 1.040$ ) and synthetic anionic detergent — Sodium Sulphonate ( $d= 1.040$ ) — showed surprising recovery rates, higher than 80% for *Ascaris* eggs in a 24 hours observation. We concluded that, because of their low cost and great availability,*



*domestic detergents can be used for the routine evaluations of beaches contamination with enteroparasites eggs, which are important indicators of faecal contamination and necessary for an adequate sanitary monitoring of the environment.*

## AGRADECIMENTOS

Somos gratos a Dra. Keyla Belfzia Feldman Marzochi pela revisão e sugestões ao manuscrito, ao Dr. Takumi Igushi pela avaliação estatística, a Marcelo Soares Brando pelo resumo em inglês, a Rogéria Leite Pelegrino pelo trabalho datilográfico do texto e a Luiz Augusto A. Batista, do Laboratório do Centro de Saúde (ENSP), pela determinação das densidades dos reagentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAVER, P. C., 1952. Observation on the epidemiology of *Ascaris* in a region of high hookworm endemicity. *J. Parasit.* 38 : 445-453.
- BELDING, D. L., 1965. *Textbook of Parasitology* - 3 ed. N. York. Meredith Ed.
- BERLINGUER, G., 1962. Ricerca e conteggio delle uova di elminti nel terreno con particolare riguardo agli ascaridi. *Parasitologia*, 4 : 147-154.
- CALDWELL, F. C. & CALDWELL, E. L., 1928. Preliminary report on observation on the development of pig and human *Ascaris* under natural conditions and studies of factors influencing development. *Parasit.* 14: 154-260.
- CALLEN, E. O. & CAMERON, T. W. M., 1960. A pre-historic revealed in coprolites. *New Sci.* 7 : 35-40.
- CAMILLO-COURA, L., 1970. *Contribuição ao estudo das geohelminthases*. Rio de Janeiro (Tese - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- CORT, W. W.; OTTO, G. F. & SPINDLER, L. A., 1929. Studies on *Ascaris* in Virginia. A preliminary report. *South med. J.* 7 : 608-614.
- FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C. & LINCICOME, D. R., 1939. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in fezes. *J. Parasit.*, 25 : 241-262.
- MARZOCHI, M. C. A., 1977. Estudo dos fatores envolvidos na disseminação dos enteroparasitas, II - Estudo da contaminação de verduras e solo de hortas na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 19 : 148-155.

- NEMESSERI, L. & HOLLO, F., 1961. *Diagnóstico parasitológico veterinário*. 1ª ed. Zaragoza, Editorial Acribia.
- OMS, 1964. *Comité de expertos de la OMS en helmintiasis*. Washington, Ser. Inf. Tec., 277.
- PINHEIRO, M. F. S.; MARZOCHI, M. C. A.; GIUGLIANO, R.; GIUGLIANO, L. G., 1977. Enteroparasitoses em uma comunidade fechada. I - Estudo do solo como elo de transmissão em um orfanato de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 7: 503-506.
- RUFFER, M. A., 1910. Preliminary note on the histology of mummier. *Brit. Med. J.* 1: 16.
- VINHA, C., 1965. Fundamentos e importância das campanhas contra os geo-helminhos no Brasil. *Rev. Bras. Malariol.*, 17: 379-406.