

## CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO *ASCARIS LUMBRICOIDES* EM LABORATÓRIO

Cristiano Lara Massara, Hélio Martins de Araújo Costa e  
Omar dos Santos Carvalho

Com o objetivo de contribuir para o estudo do *Ascaris lumbricoides* em laboratório, foram coletadas fezes em períodos de 24 horas de duas crianças com ascaridíase. As amostras fecais foram tamisadas e ressuspendidas várias vezes em água. Os sedimentos com ovos, foram cultivados em frascos de cultura de tecido em  $H_2SO_4$  0,1N e incubados a 28°C. As culturas foram oxigenadas diariamente por agitação manual. A percentagem de embrionamento dos ovos foi determinada a cada 10 dias a partir do 20º dia, obtendo-se em torno de 98,0% de embrionamento no 80º dia de cultura. O melhor dia para a recuperação de larvas em camundongos foi estabelecido infectando-se nove grupos de cinco camundongos, per os, com 200 ovos embrionados/camundongo. Cada grupo de camundongo foi sacrificado por fratura cervical a partir do 4º até 12º dia da infecção. As larvas foram recuperadas do pulmão, obtendo-se 0,45% de recuperação no 8º dia após a infecção. A determinação do inóculo foi feita utilizando-se cinco grupos de dez camundongos infectados com 200, 400, 800, 1.600 e 3.200 ovos embrionados/camundongo. A maior recuperação foi de 1,2% com o inóculo de 3.200 ovos embrionados. A melhor idade para a infecção dos camundongos foi obtida utilizando-se quatro grupos de animais, com cinco camundongos cada, com idades de 20, 30, 40 e 50 dias e inóculo de 3.200 ovos. Recuperou-se o máximo de 1,9% das larvas nos camundongos de 20 dias de idade.

Palavras-chaves: *Ascaris lumbricoides*. Cultura de ovos. Recuperação de larvas.

Focos endêmicos de helmintos ocorrem sabidamente em muitas áreas, castigando sem trégua um vasto setor da população mundial. Segundo Barretto<sup>2</sup>, infecções continuam disseminando-se em função do fenômeno migratório das populações humanas.

Em várias regiões do mundo o parasitismo por helmintos intestinais constitui um dos mais sérios problemas de Saúde Pública, principalmente pela sua alta prevalência e pela íntima correlação com o grau de desnutrição das populações envolvidas. Souza e cols<sup>14</sup> e Souza e col<sup>15</sup> mostram a quase exata superposição geográfica dessas duas condições, destacando que parasitismo e desnutrição constituem sólidos fatores sintrópicos de miséria humana.

Estudos de campo têm sido feitos, visando principalmente à terapêutica e o controle dessas endemias<sup>3 7 8 13</sup>. Estudos de laboratório têm restringido-se a alguns poucos aspectos, já que não existem técnicas e modelos experimentais adequados para a manutenção dos ciclos desses helmintos<sup>16 18 19 20</sup>.

Este trabalho tem como objetivo padronizar técnicas para o estudo do *A. lumbricoides* em laboratório. Foram estudados: a idade das culturas dos ovos, a idade dos camundongos, o tamanho do inóculo e o melhor dia para a recuperação de larvas nos camundongos.

Foi escolhido o *A. lumbricoides* por ser espécie cosmopolita, parasita de indivíduos de todas as idades e de alta prevalência.

Centro de Pesquisas "René Rachou"/FIOCRUZ.  
Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Bolsista do CNPq.

Trabalho realizado com o apoio do CNPq Proc. nº 408154/84.

Endereço para correspondência: Dr. Cristiano Lara Massara. Centro de Pesquisas "René Rachou"/FIOCRUZ, CP: 1743 - 30190 Belo Horizonte, MG.

Recebido para publicação em 19/08/89.

### MATERIAL E MÉTODOS

Este ensaio foi feito isoladamente com fezes de duas crianças e repetido em idênticas condições. Os resultados correspondem à média dos dois ensaios realizados.

Obtenção de ovos de *A. lumbricoides*

Fezes de crianças, parasitadas por *A. lumbricoides*

*coides* e diagnosticadas pelo método de Kato-Katz<sup>5</sup> foram colhidas durante 24 horas em recipientes com capacidade para um litro.

Com auxílio de bastão de vidro e água corrente as fezes de cada criança foram diluídas, homogeneizadas e passadas, individualmente, através de tamis montado em tubo de PVC (cloreto de polivinil) com três telas de diferentes malhas (900, 150 e 112 micra). O material foi recolhido diretamente em cálices de sedimentação, com capacidade para 1.000ml. Essa suspensão foi mantida em repouso por uma hora. Decorrido esse período, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com água. Este procedimento foi repetido até a obtenção de um sobrenadante claro, conforme Lutz<sup>6</sup>.

#### Culturas para obtenção de ovos embrionados

Os sedimentos contendo ovos foram transferidos para frascos de cultura de tecido contendo cerca de 10ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N<sup>4</sup>, adicionados de três gotas de solução antimicótica (miconazol), e incubados individualmente, a 28°C, durante 100 dias. Os frascos foram mantidos abertos e inclinados e as culturas oxigenadas diariamente por agitação manual.

#### Determinação da taxa de embrionamento dos ovos

A cada 10 dias, a partir do 20º e até o 100º dia, foi determinada a taxa de embrionamento dos ovos. Recolhia-se uma amostra de 0,025ml de cada cultura e colocava-se em uma placa de vidro reticulada sob uma lamínula. Essa placa era levada ao microscópio e contavam-se os ovos embrionados em 100 exemplares com ocular de 10X e objetiva de 4X. O resultado correspondia a média de três contagens.

#### Infecção dos animais e recuperação das larvas

Um total de 45 camundongos albinos, procedentes do biotério do Centro de Pesquisas "René Rachou", foi infectado, *per os*, com o auxílio de seringa com agulha de ponta romba, contendo 200 ovos embrionados de *A. lumbricoides* por animal. Foram sacrificados cinco camundongos por dia, por fratura cervical, a partir do 4º e até o 12º dia da infecção. Foram feitas incisões torácicas nos animais, sendo seus pulmões e corações isolados e fragmentados e as larvas recuperadas pelo método de Baerman modificado por Moraes<sup>9</sup>. Foram recolhidas amostras do material a partir de 40 minutos, em vidros de relógio, e examinadas até que se tornassem negativas. As larvas foram contadas em microscópio estereoscópico com ocular de 10X e objetiva de 4X. Idêntico procedimento foi feito com igual número de camundongos utilizados como controle de infecção e de mortalidade.

#### Inóculo

A determinação do melhor inóculo foi feita utilizando-se cinco grupos de 10 camundongos infectados com 200, 400, 800, 1.600 e 3.200 ovos embrionados de *A. lumbricoides* por camundongos.

#### Idade dos camundongos

A melhor idade para a infecção dos camundongos foi determinada submetendo-se ao experimento quatro grupos de cinco camundongos cada, com 20, 30, 40 e 50 dias de idade.

## RESULTADOS

#### Idade da Cultura

A Figura 1 mostra a percentagem de embrionamento dos ovos de *A. lumbricoides* observada nas duas culturas, de 10 em 10 dias, do 20º ao 100º dia. Verifica-se que a partir do 80º dia a taxa de embrionamento mostrou uma tendência a estabilizar-se em torno de 98,0%.

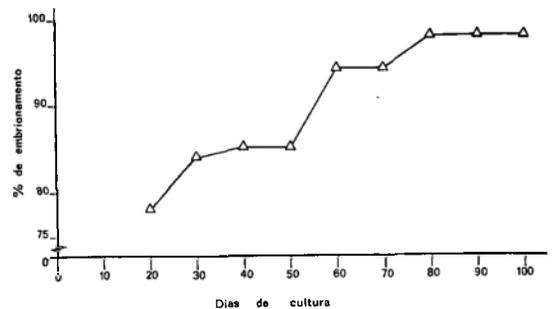


Figura 1 – Evolução da taxa de embrionamento de ovos de *A. lumbricoides*, em cultura, durante o período do ensaio.

#### Recuperação de larvas

A determinação do melhor dia para a recuperação das larvas de *A. lumbricoides* do coração e dos pulmões de camundongos experimentalmente infectados é apresentada na Figura 2. Verifica-se que, ainda no quinto dia, a taxa de recuperação era de 0,0%. No sexto dia, começou a recuperação de larvas, que atingiu o percentual mais elevado no 8º dia, com 0,45% das larvas recuperadas. No décimo segundo dia de infecção a taxa já estava reduzida a 0,05%.

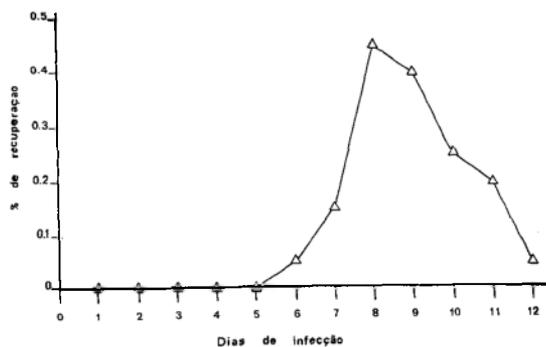


Figura 2 - Recuperação de larvas de *A. lumbricoides* dos pulmões e do coração de camundongos de 20 dias de idade, infectados experimentalmente, *per os*, com 200 ovos embrionados provenientes de culturas de 100 dias.

### Inóculo

A Figura 3 mostra a taxa de recuperação de larvas do coração e dos pulmões de camundongos experimentalmente infectados, com cargas diversas de ovos embrionados de *A. lumbricoides* no oitavo dia da infecção. Conseguiu-se uma recuperação de 0,5%, com inóculos de 200 e 400 ovos embrionados/camundongo. Com inóculos de 800 e 1.600 ovos embrionados, a recuperação foi de 1,0 e 0,4% respectivamente. Um pico de 1,2% de recuperação foi atingido com inóculo de 3.200 ovos embrionados, por camundongo.

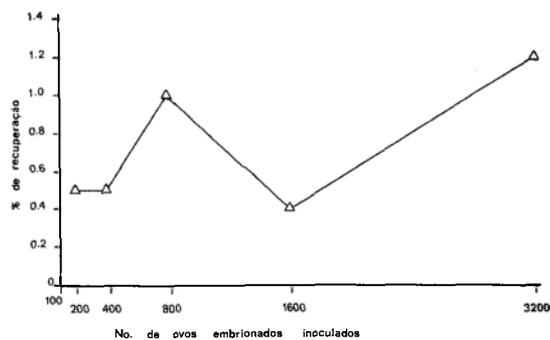


Figura 3 - Recuperação de larvas de *A. lumbricoides* de pulmões e do coração de camundongos, experimentalmente infectados, *per os*, com diferentes números de ovos embrionados provenientes de culturas de 100 dias, no oitavo dia de infecção.

### Idade dos camundongos

A Figura 4 mostra as taxas de recuperação de larvas em camundongos de 20 a 50 dias de idade, experimentalmente infectados com inóculos de 3.200 ovos embrionados por camundongo. Conseguiu-se

uma taxa de recuperação de larvas, de 1,9% nos camundongos com 20 dias de idade, 0,2% nos de 30, 0,5% nos de 40 e 1,1% nos de 50.

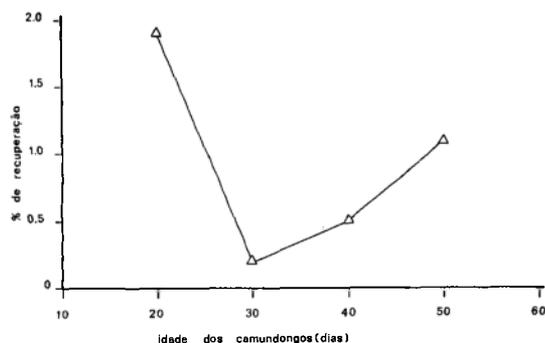


Figura 4 - Recuperação de larvas de *A. lumbricoides* de pulmões e do coração de camundongos de diferentes idades, infectados experimentalmente, *per os*, com 3.200 ovos embrionados provenientes de culturas de 100 dias, no oitavo dia de infecção.

## DISCUSSAO

Estudos objetivando determinar o período de incubação de ovos de *A. lumbricoides* em cultura para estarem aptos à infecção têm sido realizados por vários autores. Souza e cols<sup>12 16</sup>, conseguiram infectar camundongos com ovos embrionados, obtidos de fêmeas de *A. lumbricoides*, incubados durante 18 dias, com a recuperação de larvas nos pulmões. Dados semelhantes foram obtidos por Artigas e col<sup>1</sup> conseguindo infectar camundongos com ovos de *A. lumbricoides* embrionados com pelo menos 18 dias. Ambos os trabalhos, entretanto, discordam de Stoll<sup>17</sup> sobre a necessidade de um período mais longo de incubação, para evidenciar a fertilidade dos ovos e assegurar maior infectividade aos mesmos.

Os resultados aqui obtidos mostram que a maior porcentagem de ovos embrionados nas culturas ocorre a partir do 80º dia.

O oitavo dia após a infecção mostrou-se a melhor ocasião para recuperar larvas de *A. lumbricoides* dos pulmões e coração de camundongos experimentalmente infectados, concordando com as observações realizadas por vários autores<sup>10 11 13 16</sup>.

Com referência ao tamanho do inóculo, alguns autores<sup>10 12 16</sup> infectaram camundongos com 1.500 ovos embrionados, mas não quantificaram a recuperação de larvas. Os dados aqui obtidos, usando inóculos crescentes, evidenciaram que o número de larvas recuperadas não corresponde diretamente ao tamanho do inóculo. De fato, conseguiu-se, às vezes, valores

menores de recuperação de larvas (0,4%) para inóculos maiores (1.600 ovos embrionados) e valores maiores (0,5%) para inóculos menores (200 e 400 ovos embrionados/camundongo).

Na infecção de camundongos de diversas idades (20 a 50 dias) verificou-se que camundongos de 20 dias apresentavam melhor recuperação. Alguns autores<sup>10 11 12 16</sup> têm utilizado camundongos para testar a viabilidade de ovos após tratamento, mas não fazem referência à idade dos mesmos.

Para as condições em que foi realizado o presente trabalho, foram inferidas as conclusões abaixo:

- o número de ovos embrionados de *A. lumbricoides* é percentualmente crescente a partir do 20º dia, podendo necessitar de 80 dias ou mais para alcançar o topo do embrionamento.

- A idade ideal dos camundongos para as inoculações com ovos de *A. lumbricoides* e recuperações de larvas foi a de 20 dias de nascidos.

- O inóculo de 3.200 ovos embrionados de *A. lumbricoides* por camundongo de 20 dias de idade oferece melhores resultados que inóculos menores.

#### SUMMARY

*With the purpose of standardising techniques for the laboratory study of Ascaris lumbricoides, faeces were collected from children parasitised by A. lumbricoides, during a 24 hour period. The fecal samples were sieved and resuspended several times in water. The sediment containing the eggs was cultivated in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1N in tissue culture flasks, at 28°C. The culture of embryonated eggs was determined every ten days starting from the 20th day of culture achieving around 98.0% embryogeny on the 80th day of culture. The best day to recover larvae from mice was determined by infecting 9 groups of 5 mice per os with 200 embryonated eggs/mouse. Each mouse was sacrificed by cervical rupture starting on the 4 day up to the 12 day of infection. On the 8 day after the infection 0.45% of the larvae were recovered from the lungs. The inoculum determination was performed by using 5 groups of 10 infected mice with 200, 400, 800, 1.600 and 3.200 embryo eggs/mouse. The best age for recovery of infection was achieved by using 4 groups animals, with 5 mice/group, with age varying from 20 to 50 days and an inoculum of 3.200 eggs. The best recovery (1.9% was obtained from the group of 20 days of age.*

*Key-words: Ascaris lumbricoides. Egg culture. Larval recovery.*

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a José Geraldo Amorim da Silva e Antonio Carlos do Prado, pela indispensável

ajuda técnica.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Artigas PT, Ueta MT. Sobre a evolução do *Ascaris lumbricoides* Lineu, 1738. In: Resumos do VI Congresso da Federación Latinoamericana de Parasitólogos. São Paulo p. 238, 1983.
2. Barretto MP. Movimentos migratórios e sua importância na epidemiologia de doenças parasitárias no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1:91-102, 1967.
3. Cimerman B. Contribuição para o estudo do controle da ascariase humana através de quimioterápico. Tese de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1984.
4. Fairbairn D. The in vitro hatching of *Ascaris lumbricoides* eggs. Canadian Journal of Zoology 39:153-62, 1961.
5. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 14:397-400, 1972.
6. Lutz A. O *Schistosoma mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 11:121-5, 1919.
7. Metene F, Chaia G, Chiari L, Araujo SM, Abreu IB. Mebendazole um novo anti-helmintico de ação terapêutica polivalente. Folha Medica 64:139-45, 1972.
8. Miller MJ, Farahmandian I, Arfaa F, Katz N, Winsor E, Bennett E. An evaluation of levamisole for treatment of ascariasis. Southern Medical Journal 71:137-40, 1978.
9. Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidose no Brasil. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública 1:507-624, 1948.
10. Moreira C, Souza DWC. Estudo de ação de drogas ascariidas sobre a embriogênese de ovos retirados de fêmeas expelidas após tratamento humano. In: Resumos do IX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Fortaleza, p. 217, 1973.
11. Pitts TD. In vitro culture of the larvae of *Ascaris lumbricoides* suun. A report on progress. Journal of Parasitology 46 section 2 (suppl): 24-5, 1960.
12. Souza DWC, Carvalho OS, Savi A. Viabilidade de ovos de *Ascaris lumbricoides* expelidos após terapêutica humana. I. Levamisole e pamoato de pirantel. In: Resumos do XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília p. 170, 1977.
13. Souza DWC, Neves J, Lemos MS. Estudo comparativo entre a eficácia terapêutica do pamoato de pirantel e do levamisole na ascariíase. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 14:67-72, 1972.
14. Souza DWC, Souza MSL, Neves J. Helmintíases Intestinais. In: Neves J. Diagnóstico e Tratamento das doenças infectuosas e parasitárias. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 734-757, 1978.
15. Souza MSL, Souza DWC. Nutrição e infecção. In:

- Neves J. Doenças Infecciosas e Parasitárias em Pediatria. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 68-78, 1981.
16. Souza MSL, Souza DWC, Carvalho OS, Neves J, Massara CL. Viabilidade de ovos de *Ascaris lumbricoides* após tratamento humano com medicamentos específicos. I. Levamisole e pamoato de pirantel. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 27:197-200, 1985.
  17. Stoll NR. When are *Ascaris* eggs infective? *Journal of Parasitology* 20:126, 1933.
  18. Vanhaelen-Lindhout E, Smit AM. Abnormally shaped eggs of *Trichuris trichiura* after thiabendazol treatment. *Tropical and Geographical Medicine* 23:381-4, 1971.
  19. Wagner ED, Chavarria AP. In vivo effects of a new anthelmintic, mebendazole (R. 17,635) on the eggs of *Trichuris trichiura* and hookworm. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 23:151-3, 1974.
  20. Wagner ED, Chavarria AP. Morphologically altered eggs of *Trichuris trichiura* following treatment with mebendazole. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 23:154-7, 1974.