



# Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*

Destruction of *Toxocara canis* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*

Luiza Neme Frassy<sup>1</sup>, Fabio Ribeiro Braga<sup>1</sup>, André Ricardo e Silva<sup>1</sup>, Jackson Victor de Araújo<sup>1</sup>, Sebastião Rodrigo Ferreira<sup>1</sup> e Leandro Grassi de Freitas<sup>2</sup>

### RESUMO

**Introdução:** *Toxocara canis* é um ascarídeo parasita do intestino delgado de cães, causador da *larva migrans* visceral em seres humanos. **Métodos:** Com o objetivo de demonstrar a eficácia do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Toxocara canis* em condições laboratoriais, foi montado ensaio experimental em placas de Petri com ágar-água 2%. **Resultados:** Houve atividade ovicida de 43,8% ( $p < 0,01$ ) do grupo tratado em relação ao grupo controle durante os intervalos estudados. **Conclusões:** Os resultados demonstrados no presente trabalho sugerem a empregabilidade de *Pochonia chlamydosporia* como uma alternativa de controle biológico dos ovos embrionados de *Toxocara canis*.

**Palavras-chaves:** Fungos nematófagos. *Pochonia chlamydosporia*. *Toxocara canis*.

### ABSTRACT

**Introduction:** *Toxocara canis* is an ascarid parasite of the small intestine of dogs that causes visceral *larva migrans* in humans. **Methods:** With the aim of demonstrating the effectiveness of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions, a trial was set up in Petri dishes with 2% agar-water. **Results:** There was ovicidal activity of 43.8% ( $p < 0.01$ ) in the treated group in relation to the control group over the periods studied. **Conclusions:** The results from the present study suggest that *Pochonia chlamydosporia* can potentially be used as an alternative biological control for embryonated *Toxocara canis* eggs.

**Key-words:** Nematophagous fungi. *Pochonia chlamydosporia*. *Toxocara canis*.

Os estudos sobre parasitismo em animais de estimação vêm despertando crescente interesse, frente à associação restrita e íntima entre o homem e os animais e sua consequência em saúde pública<sup>1</sup>. *Toxocara canis* é um ascarídeo parasita do intestino delgado de cães, com distribuição cosmopolita<sup>2,3</sup>.

Os casos de *larva migrans* visceral são ocasionados frequentemente por *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, por ingestão de ovos embrionados do ambiente. Seres humanos e outros mamíferos quando infectados

por larvas de *Toxocara canis* comportam-se como hospedeiros paratênicos, não permitindo o desenvolvimento completo do helminto. As larvas, contudo, podem sobreviver por longos períodos no organismo humano, realizando migrações por órgãos e tecidos, onde permanecem encistadas e viáveis, podendo determinar manifestações clínicas diversas, que caracterizam a síndrome de larva migrans visceral, a larva migrans ocular e a toxocaríase oculta<sup>4</sup>.

Segundo Barriga<sup>2</sup>, algumas medidas de prevenção da toxocaríase seriam o controle da população canina, a educação do público sobre o potencial zoonótico desse nematóide e a limitação do acesso de animais a áreas de lazer. Por outro lado, a alta resistência dos ovos no ambiente e a dificuldade de desinfecção justificam a necessidade da implementação de medidas alternativas que ajudem na descontaminação do solo, sendo essa a principal fonte de contaminação<sup>3,5</sup>. Entre elas, está o uso de fungos nematófagos que estão presentes no meio ambiente e, cuja ação está concentrada no ambiente fecal e direcionada ao combate dos ovos e das larvas de vida livre dos geohelmintos. Dentre esses fungos, destaca-se a espécie *Pochonia chlamydosporia* considerada ovicida, pois causa a destruição de ovos por consequência do seu parasitismo<sup>6</sup>.

O presente estudo objetivou avaliar *in vitro* a ação ovicida do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC1, VC4, VC5, VC12 e VC31) sobre ovos de *Toxocara canis* em diferentes intervalos de tempo.

Cinco isolados do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (VC1, VC4, VC5, VC12 e VC31) foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio de cultura Corn-Meal-Agar 2%, no escuro a 4°C por 10 dias. Dois isolados (VC1 e VC4) são provenientes do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil. E os outros três (VC5, VC12 e VC31) são provenientes do laboratório de Controle Biológico de Nematóides do Departamento de Fitopatologia da UFV.

Ovos de *Toxocara canis* foram obtidos pela dissecação do útero de fêmeas adultas provenientes de um cão jovem parasitado, morto por causas naturais. A identificação dos exemplares adultos e dos ovos foi realizada com base nas descrições de Urquhart e cols<sup>3</sup>. Os ovos foram lavados 10x em água destilada por centrifugação a 1.000rpm por 5 minutos cada vez, desprezando o sobrenadante ao fim de cada centrifugação. Posteriormente, os ovos foram incubados a 25°C por 14 dias em solução contendo 0,05% de formalina, 0,005% de sulfato de estreptomicina e 0,01% de cloranfenicol. Após este período, foi repetido o processo de lavagem em água destilada como descrito acima.

Ovos de *Toxocara canis* foram analisados morfológicamente quanto a sua integridade por meio de microscopia óptica, objetiva de 10 x, seguindo os critérios descritos por Araújo cols<sup>7</sup>. A seguir,

1. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

2. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

**Endereço para correspondência:** Dr. Fabio R. Braga. Dept<sup>o</sup> de Veterinária/ UFV. Av. Ph Rolfes s/n, 36570-000 Viçosa, MG.

Tel: 55 31 3899-1458.

e-mail: fabioribeirobraga@hotmail.com

Recebido para publicação em 06/07/2009

Aceito em 10/12/2009

foram vertidos sobre a superfície das placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo apenas o meio ágar-água 2% com isolados fúngicos crescidos por 10 dias e sem fungo como controle, em temperatura de 26°C, sendo feitas 10 repetições para cada grupo. Nos tratamentos, cada placa de Petri continha mil ovos de *Toxocara canis* com apenas um dos isolados fúngicos e mil ovos sem fungo (controle). Nos intervalos de cinco, 10 e 15 dias, cerca de cem ovos foram retirados de cada placa contendo o isolado fúngico e do controle (sem fungo) segundo a técnica descrita por Araújo e cols<sup>2</sup> e, colocados em lâminas de vidro com uma gota de azul de Amam 1%. Após isso, os ovos foram avaliados por meio de microscopia de luz em objetiva de 40x de acordo com os parâmetros estabelecidos por Lysek cols<sup>3</sup>: tipo 1, efeito fisiológico, bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas são observadas aderidas à casca; tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração de hifas através da casca; e tipo 3 efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo.

Os dados do ensaio experimental ao longo dos intervalos foram submetidos ao teste não paramétrico de Friedman com 1% de probabilidade<sup>9</sup>.

Os resultados percentuais para os efeitos tipo 1, 2 e 3 aos cinco, 10 e 15 dias para os grupos tratados com os fungos *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC4, VC31, VC1, VC12 e VC5 e para o grupo controle estão representados na Tabela 1. Durante o presente trabalho, o fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4, VC31, VC1, VC12 e VC5) demonstrou resultados percentuais de ação ovicida (efeito do tipo 3) sobre os ovos de *Toxocara canis* em todos os intervalos estudados. No grupo controle, não foi constatado a presença de fungos. No grupo tratado com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4, VC31, VC1, VC12 e VC5) foi observada a presença de ovos rompidos a partir do 15º dia de interação (Figura 1).

O solo de praças e parques públicos constitui via de transmissão para zoonoses parasitárias<sup>10</sup>. Segundo Bourdeau<sup>11</sup>, ovos de *Toxocara canis*, devido à consistência de sua cutícula externa, permanecem viáveis por longo período no ambiente, expondo a população humana ao risco de infecção desenvolvimento da doença. No presente trabalho, demonstrou-se que a ação de *Pochonia chlamydosporia* se manteve durante o experimento, sendo responsável pela destruição dos ovos ao final de 15 dias de interação. Esta informação é importante, pois segundo Overgaauw<sup>12</sup> e Urquhart e cols<sup>3</sup> os ovos de *Toxocara canis* atingiriam seu desenvolvimento em torno de 2 a 6 semanas tornando-se infectantes.

**TABELA 1 - Percentual de atividade ovicida e desvios padrão do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (VC4, VC31, VC1, VC12 e VC5), e o grupo controle sem fungos, sobre ovos de *Toxocara canis* nos intervalos de 5, 10 e 15 dias.**

Isolados	5 dias de interação		
	efeito do tipo 1*	efeito do tipo 2**	efeito do tipo 3***
VC4	47,7 <sup>A</sup> ± 17,01	26,9 <sup>A</sup> ± 7,99	25,4 <sup>A</sup> ± 10,95
VC31	54 <sup>A</sup> ± 14,62	24,8 <sup>A</sup> ± 11,66	21,2 <sup>A</sup> ± 7,74
VC1	32,5 <sup>A</sup> ± 32,55	29,6 <sup>A</sup> ± 14,73	39,9 <sup>A</sup> ± 35,13
VC12	39,9 <sup>A</sup> ± 11,67	42 <sup>A</sup> ± 9,74	18,1 <sup>A</sup> ± 16,23
VC5	63,7 <sup>A</sup> ± 8,21	24,8 <sup>A</sup> ± 9,23	10,5 <sup>A</sup> ± 7,87
Controle	0 <sup>B</sup> ± 0	0 <sup>B</sup> ± 0	0 <sup>B</sup> ± 0
Isolados	10 dias de interação		
	efeito do tipo 1*	efeito do tipo 2**	efeito do tipo 3***
VC4	4,2 <sup>A</sup> ± 4,39	19,1 <sup>A</sup> ± 11,40	76 <sup>A</sup> ± 11,90
VC31	2 <sup>A</sup> ± 2,58	55 <sup>B</sup> ± 12,37	43 <sup>B</sup> ± 11,98
VC1	8,2 <sup>A</sup> ± 12,09	40,7 <sup>A,B</sup> ± 19,87	53,6 <sup>B</sup> ± 21,45
VC12	2 <sup>A</sup> ± 2,94	43,2 <sup>B</sup> ± 19,35	54 <sup>A,B</sup> ± 19,42
VC5	0,1 <sup>A</sup> ± 0,31	46,8 <sup>B</sup> ± 30,35	59 <sup>A,B</sup> ± 25,24
Controle	0 <sup>B</sup> ± 0	0 <sup>C</sup> ± 0	0 <sup>C</sup> ± 0
Isolados	15 dias de interação		
	efeito do tipo 1*	efeito do tipo 2**	efeito do tipo 3***
VC4	15 <sup>A</sup> ± 13,00	34,8 <sup>A</sup> ± 9,65	47,3 <sup>A</sup> ± 12,73
VC31	0,6 <sup>A</sup> ± 1,34	46,9 <sup>A</sup> ± 12,74	52,5 <sup>A</sup> ± 13,13
VC1	24 <sup>A,B</sup> ± 15,43	32 <sup>A,B</sup> ± 9,86	43,1 <sup>A</sup> ± 8,64
VC12	26,1 <sup>A,B</sup> ± 19,82	35 <sup>A</sup> ± 9,85	39 <sup>A</sup> ± 12,09
VC5	34 <sup>B</sup> ± 15,13	29,1 <sup>A,B</sup> ± 9,48	36,9 <sup>A,B</sup> ± 11,70
Controle	0 <sup>C</sup> ± 0	0 <sup>C</sup> ± 0	0 <sup>C</sup> ± 0

Percentuais seguidos da mesma letra maiúscula não diferem (P>0,01) - Teste de Friedman.

\*Efeito do tipo 1, efeito fisiológico, bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas são observadas aderidas à casca; \*\* Efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração de hifas através da casca; \*\*\* Efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo.

Braga e cols<sup>6</sup> demonstraram a eficácia dos isolados VC1 e VC4 do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*, nematóide gastrointestinal comum de seres humanos, nos intervalos de sete, 10 e 14 dias, e ao final do experimento estes autores registraram percentuais para a ação ovicida acima de 26% para ambos os isolados testados. Contudo, quando esse efeito é comparado com os resultados



**FIGURA 1- Hifas do fungo *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo destruído de *Toxocara canis* (seta preta) aos 15 dias de interação. Microscopia óptica com aumento de 40x.**

do presente trabalho ao final de 15 dias, nota-se que sua ação foi maior sobre ovos de *Toxocara canis* cujos valores percentuais correspondem a 43,1% e 47,3% para VC1 e VC4, respectivamente.

Segundo Lysek e cols<sup>8</sup>, um fungo é caracterizado como ovicida se durante o processo de infecção dos ovos apresentar o efeito do tipo 3 (ação ovicida). Esse fato está de acordo com os resultados percentuais demonstrados pelos isolados fúngicos de *Pochonia chlamydosporia* no presente trabalho.

Em outros trabalhos, Braga cols<sup>13</sup> mencionam que, tanto o isolado VC1 ou VC4 de *Pochonia chlamydosporia* poderiam ser utilizados no controle biológico de ovos de parasitos gastrintestinais, uma vez que têm demonstrado a mesma ação ovicida ( $p > 0,01$ ) em condições laboratorias. No entanto, se faz necessário à realização de mais pesquisas que possam demonstrar a interação destes e de outros isolados fúngicos de *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de nematóides gastrintestinais de animais domésticos e de seres humanos. No presente trabalho, foram utilizados os isolados fúngicos VC1 e VC4 e outros isolados de *Pochonia chlamydosporia* apresentando a mesma ação ovicida ( $p > 0,01$ ) sobre os ovos de *Toxocara canis*.

O mecanismo de penetração dos fungos ovicidas nos ovos parasitados ainda não está totalmente elucidado, e por isso existem diferenças na sua atividade ovicida (Braga e cols<sup>14</sup>). Entretanto, vários autores admitem que a atividade enzimática seja um dos principais componentes no processo de ataque e penetração através dos ovos e por isso estes fungos poderiam ser utilizados no controle biológico<sup>15</sup>.

Dessa forma, por meio dos resultados percentuais demonstrados no presente trabalho, sugere-se a empregabilidade de *Pochonia chlamydosporia* como uma alternativa de controle biológico dos ovos embrionados de *Toxocara canis* eliminados nas fezes, e com isso interferindo diretamente no ciclo biológico deste parasito.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse.

## SUPORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## REFERÊNCIAS

- Vasconcellos MC, Barros JSL, Oliveira CS. Parasitas gastrointestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro, RJ. Rev Saúde Pública 2006; 40: 321-323.
- Barriga OO. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocarasis and the possibilities of immunological control. Vet Parasitol 1998;29:295-234.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. Parasitologia Veterinária. 2<sup>ª</sup> edition Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; 1988.
- Taylor MRH, Keane CT, O'Connor P, Girdwood RWA, Smith H. Clinical features of covert toxocarasis. Scand J Infect Dis 1987;19:693-696.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO, Silva AR, Campos AK. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. Experiment Parasitol 2009;121:338-341.
- Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). Rev Soc Bras Med Tropic 2007;40: 356-358.
- Araújo JV, Santos MA, Ferraz S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. Arq Bras Med Vet Zootec 1995;47:37-42.
- Lysek H, Fassatióv O, Pineda NC, Hernández NL. Ovicidal fungi in soils of Cuba. Folia Parasitol 1982;29:265-270.
- Ayres M, Ayres JM, Ayres DL, Santos, A.S. *Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas*. Belém: Sociedade Civil Maniraua, 2003.
- Santarém VA, Giuffrida R, Zanin GA. Larva *migrans* cutânea: ocorrência de casos humanos e identificação de larvas de *Ancylostoma* spp em parque público do município de Taciba, São Paulo. Rev Soc Bras Med Tropic 2004;37:179-181.
- Bourdeau P. *Toxocara canis*: infestation du chien et de l'homme, méthodes de lutte. Point Vet 1986;18:551-564.
- Overgaauw PAM. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocarosis. Critical Rev Microbiol 1997;23:215-231.
- Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO, Correa DN, Pereira CAJ. *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. World J Microbiol Biotechnol 2008; 24: 2713-2716.
- Braga FR, Araújo JV, Carvalho RO, Silva AR, Araujo JM, Tavela AO, Campos AK, Costa PR. Ovicidal effect of nematophagous fungi on *Taenia taeniaeformis* eggs. World J Microbiol Biotechnol 2009;25:533-535.
- Lysek H, Sterba J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. Folia Parasitol 1991; 38: 255-259.