

AÇÃO DE DIFERENTES DESINFETANTES SOBRE VIABILIDADE E MORTALIDADE DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO DE *Ancylostoma* SPP.*

Elizabeth Cristina Ferreira dos Santos¹⁺, Milena Batista Carneiro², Pedro Vianna Tavares³, Lilian Cristina de Sousa Oliveira Batista², Raquel Moreira Pires dos Santos Melo³, Thaís Ribeiro Correia Azevedo⁴ e Fabio Barbour Scott⁵

ABSTRACT. Santos E.C.F., Carneiro M.B., Tavares P.V., Batista, L.C.S.O., Melo R.M.P.S., Azevedo T.R.C & Scott F.B. [Action of different disinfectants on viability and mortality of third-stage larvae of *Ancylostoma* spp.] Ação de diferentes desinfetantes sobre viabilidade e mortalidade de larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34 (Supl. 1):55-59, 2012. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: ecfs2@yahoo.com.br

Have great potential zoonotic and compromise animal health due to its action hemato-phagous. Objectives of this study was to evaluate the effect of different disinfectant solutions on the third stage larvae of *Ancylostoma* spp. purpose environmental control. They were obtained from various coproculture from two dogs naturally infected with *Ancylostoma* spp. Seven days after the third stage larvae were recovered, quantified and stored in tubes Falcon comprising six groups with six replicates each. Larvae were treated with sodium hypochlorite 100% benzalkonium chloride 15 and 30%, 7.99% formaldehyde, 70% ethanol and distilled water (control group) and assessed for motility in times of 1, 6 and 24 hours after the start of the challenge. In 1 hour, ethanol 70% and sodium hypochlorite 100% disinfectants are highly effective in the elimination of third stage larvae of *Ancylostoma* spp. and there significant difference, while formaldehyde 7.99% obtained the same effect in time of 24 hours. For evaluation of different concentrations of sodium hypochlorite was held forming groups 5 and 6 replicates, and treated with distilled water (control) and sanitary water in concentrations of 100%, 50%, 25% and 12.5% . Were evaluated for motility at times of 10 and 30 minutes and 1 hour. There was a significant difference in bleach to 50%. The treatment with bleach at a concentration of 12.5% did not show a percentage of mortality of larvae satisfactory in any of the evaluated times.

KEY WORDS. *Ancylostoma*, Disinfectants, Zoonotic.

RESUMO. Objetivos do presente estudo foi avaliar a ação de diferentes soluções de desinfetante sobre larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp. com

finalidade de controle ambiental. As foram obtidas a partir de varias coprocultura de dois cães naturalmente infectados com *Ancylostoma* spp. Após

*Recebido em 6 de novembro de 2012.

Aceito para publicação em 26 de dezembro de 2012.

¹ Médica-veterinária, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: milenabatistacarneiro@hotmail.com; ⁺Autor para correspondência. E-mail: ecfs2@yahoo.com.br - bolsistas CAPES.

² Médico-veterinário, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mails: pviannavet@gmail.com; liliancsobatista@hotmail.com - bolsista CNPq.

³ Zootecnista, DSc. Universidade Federal de São João Del Rey, Praça Frei Orlando, 170, Centro São João Del Rei, MG 36307-352, Brasil. E-mail: raquelnpsm@gmail.com

⁴ Médico-veterinário, DSc. Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP) Universidade Federal Rural do Rio e Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: thaisrca@gmail.com

⁵ Médico-veterinário, *PhD*, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail:scott.fabio@gmail.com

sete dias as larvas de terceiro estágio foram recuperadas, quantificadas e acondicionadas em tubos de Falcon compreendendo seis grupos com seis repetições cada. As larvas foram tratadas com hipoclorito de sódio 100%, cloreto de benzalcônio 15 e 30%, formaldeído 7,99%, álcool 70% e água destilada (grupo controle) e avaliada quanto à motilidade nos tempos de 1, 6 e 24 horas após o início do desafio. Em 1 hora, o álcool 70% e hipoclorito de sódio 100% são desinfetantes altamente eficazes na eliminação de larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp. e houve diferença significativa, enquanto que o formaldeído 7,99% obteve a mesma eficácia no tempo de 24 horas. Para avaliação de diferentes concentrações de Hipoclorito de sódio realizou-se a formação 5 grupos e 6 repetições, sendo tratadas por água destilada (controle) e água sanitária nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%. Foram avaliadas quanto à motilidade nos tempos de 10 e 30 minutos e 1 hora. Houve uma diferença significativa na água sanitária a 50% e 25% com os demais grupos em 30 minutos. O tratamento com água sanitária na concentração de 12,5% não apresentou um percentual de mortalidade de larvas satisfatório em nenhum dos tempos avaliados.

PALAVRAS-CHAVE. *Ancylostoma*, desinfetante, zoonose.

INTRODUÇÃO

Os nematóides *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense* possuem uma grande destaque dentro do cenário das zoonoses de grande importância em saúde pública, ambas são responsáveis pela *Larva migrans* cutânea e a enterite eosinofílica causada por *A. caninum*.

A distribuição é cosmopolita, apesar de ser comum em países em desenvolvimento, onde há cães domiciliados sem tratamento anti-helmíntico de rotina e cães errantes excluídos da maioria dos programas de sanidade animal, favorecem a disseminação através das fezes ovos de helminto, tais como *Ancylostoma* sp. Esses animais transitam em ambientes frequentados por adultos, crianças e imunocomprometidos que podem se infectar na manipulação do solo contaminado com larva L3 em locais como praças, praias em outras vias públicas.

É importante que métodos de prevenção e controle de parasitadas sejam implantados, a fim de reduzir a contaminação ambiental pela infecção de ovos infectados e larvas infectantes. Nesse sentido faz-se necessário a utilização de métodos de inativação de larvas e ovos no ambiente através de-

sinfetante são utilizados no dia a dia nas residências e áreas comerciais.

Objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de diferentes soluções de desinfetantes sobre larvas de terceiro estágio *Ancylostoma* (Dubini 1843) com a finalidade de prevenção e controle ambiental.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos cães infectados naturalmente por *Ancylostoma* spp.

O trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental de Produtos Parasiticidas (LQEPV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no município de Seropédica.

Foram utilizados 2 cães da raça beagle que eram mantidos em canis individuais do laboratório LQEPV, comprovadamente parasitados pelo nematóide *Ancylostoma* spp. por meio da técnica de exame coproparasitológico de Centrífugo-Flutuação Simples realizada no mesmo laboratório. Em seguida, foi realizada a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) segundo a técnica de Gordon e Whitlock (1939, modificada). A amostra fecal desses cães foi realizado um pool para formação de várias coprocultura com finalidade de obtenção de larvas de *Ancylostoma* spp. Estas coprocultura foram mantidas por sete dias em estufa a 26°C, estando entre 23-30°C que é a temperatura favorável ao desenvolvimento pré-parasitário das espécies deste nematóide (Freitas 1982). As L₃ recuperadas foram contadas em seis alíquotas de 100µmL, media resultante foi de 33 larvas\ 100µmL sob microscopia óptica com objetiva de 10x.

Avaliação da ação desinfetante sobre a mortalidade de larvas de *Ancylostoma* spp.

As larvas foram acondicionadas em um frasco do tipo Erlenmeyer e então, suspensos em água destilada. Foi realizada a contagem das larvas na suspensão segundo Oshima (1961). Posteriormente trinta seis alíquotas de 3 mL contendo aproximadamente 980 larvas foram separadas e colocadas em tubos de Falcon de 12 mL e centrifugados por três minutos a 1500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, as amostras foram divididas em seis grupos com seis repetições cada.

As amostras foram re-suspensas com os respectivos tratamentos até completarem dois mL de solução. O primeiro grupo foi re-suspense em água destilada representando o grupo controle. O segundo

foi submetido ao tratamento com um quaternário de amônia, sendo uma solução desinfetante comercial à base de Cloreto de Benzalcônio 15%. O terceiro grupo foi re-suspenso em Álcool 70°GL O quarto grupo foi submetido ao tratamento com Hipoclorito de Sódio entre 100%. O quinto com um desinfetante comercial à base de formaldeído 7,99% e sexto e ultimo grupo Cloreto de Benzalcônio 30%. As amostras foram expostas aos devidos tratamentos por uma hora e em seguida centrifugadas por três minutos a 1500 rpm, sendo o sobrenadante desprezado. Os tubos foram completados com água destilada e novamente centrifugados repetindo esta operação por três vezes com o intuito de retirar completamente os desinfetantes utilizados. Ao final, os tubos contendo as larvas tratadas foram preenchidos com água destilada até completarem dois mililitros da solução. Todo material foi identificado e mantido em estufa climatizada com demanda bioquímica de oxigênio, com temperatura de $27 \pm 1^\circ$ C e umidade relativa do ar de $75 \pm 10\%$ por 2 dias. Os tubos foram vedados com algodão hidrofóbico e homogeneizados periodicamente para garantir a oxigenação necessária para a viabilidade das larvas.

Todas as amostras foram avaliadas quanto à motilidade da larva nos dias 0 (1h e 6h, após o tratamento), +1 (24h após o tratamento). As frações de cada uma das amostras foram avaliadas foram alíquotas de 25µL sob microscopia óptica. A mortalidade das larvas foi baseada na motilidade (Verocai et al. 2010, Tavares et al. 2011).

Avaliação de diferentes diluições na ação de hipoclorito de sódio contra as larvas *Ancylostoma* spp.

Utilizando a mesma metodologia descrita no tópico anterior para preparo de soluções, e média aproximada de larvas em 30 alíquotas de 3 mililitros foi de 950 larvas utilizadas para forma cinco grupos com seis repetições cada.

As amostras foram re-suspensas com os respectivos tratamentos até completarem dois mililitros de solução. O primeiro grupo foi re-suspenso em água destilada representando o grupo controle. O segundo foi submetido ao tratamento com hipoclorito de sódio a 100%, já nos demais grupos foram realizadas diluições, fracionando em hipoclorito de sódio e a água destilada. Baseado nisso, o terceiro grupo de tratamento foi de hipoclorito de sódio a 50% e quarto grupo de hipoclorito de sódio a 25% e o último grupo foi de hipoclorito de sódio a 12,5%.

As amostras foram avaliadas quanto à motilidade da larva no total de uma hora com finalidade de verificar em que momento ocorre a mortalidade de 100% da amostra. As avaliações ocorreram 10 e 30 segundos, 1 hora após o tratamento. As frações de cada uma das amostras foram avaliadas em alíquotas de 25µL sob microscopia óptica. A mortalidade das larvas foi baseada na motilidade (Verocai et al. 2010, Tavares et al. 2011).

Análise dos dados

Todos os dados foram analisados estatisticamente, sobre a viabilidade da larva, foi utilizado o Teste de Comparação de Proporções Múltiplas segundo Zar (1999).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Segundo Balassiano (2007) observou que mesmo com higienização ambiental adequada, 43,8% dos cães estavam infectados com endoparasitose e 48,8% foi administrado anti-helmíntico a 30 dias e permaneceram infectado, podendo ser explicado, na medida que alguns parasitas podem permanecer incrustar na musculatura pelo menos 240 dias, no caso do *A. caninum* (Stoye 1973). Outra possibilidade e que o desinfetante não foi adequado para inativação dos ovos de helmintos, já que ovos e larvas infectantes podem resistir à ação de alguns desinfetantes e permanecem no ambiente por anos. Este fato foi observado no presente estudo, com o desinfetante Cloreto de Benzalcônio nas concentrações de 15% e 30% que não apresentou diferença significativa em nenhuma das avaliações na mortalidade de larva de L3 de *Ancylostoma* spp. podendo ser visualizada na tabela 1. Essas larvas podem ainda ser uma ameaça para a saúde humana e animal, mesmo depois exposição desses desinfetante.

Tavares (2011) constatou após 21 dias de incubação de ovos *Toxocara cati* exposto por 60 minutos ao hipoclorito de sódio 2-2,5%, onde 6,08% ovos foram degenerados. No presente estudo, na concentração de hipoclorito de sódio 100% em 10 minutos de avaliação, ocorreu uma letalidade de 100% das larvas de L3 de *Ancylostoma* spp. e repetiu-se o mesmo resultado na concentração de 50% de hipoclorito de sódio em 30 minutos após o desafio (Tabela 2), provavelmente pela maior concentração de cloro ativo que lesionou a cutícula fina da larva do nematóide.

Morrondo et al. (2006) e Verocai et al. (2010) utilizando os mesmos desinfetantes, constataram que o álcool 70°GL foi 100% e 97,2% eficaz na

inibição da embriogênese dos ovos *T. canis*, respectivamente. No presente estudo obteve-se o resultado superior com mortalidade de 100% das larvas de L3 de *Ancylostoma spp* em todas as avaliações de álcool 70°GL, no entanto era de se esperar devido à

Tabela 1. Número médio com desvio padrão e percentual médio de larvas L₃ vivas de *Ancylostoma spp*. submetidos aos tratamentos com cloreto de benzalcônio 15%, álcool 70°GL, hipoclorito de sódio 100% e formaldeído 7,99% e cloreto de benzalcônio 15% durante as avaliações.

Grupos	Horas após o desafio		
	1 hora	6 horas	24 horas
Controle			
Média	27,66	37,5	36
Desvio padrão	12,84	13,50	8,22
%	65,31 ^a	71,32 ^a	74,82 ^a
Álcool 70°GL			
Média	0	0	0
Desvio padrão	0	0	0
%	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Hipoclorito de sódio 100%			
Média	0	0	0
Desvio padrão	0	0	0
%	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Formaldeído 7,99%			
Média	11	1	0
Desvio padrão	5,32	0,89	0
%	55,43 ^a	2,64 ^b	0 ^b
Cloreto de Benzalcônio 15%			
Media	24,83	23,16	28,16
Desvio padrão	11,92	14,74	6,96
%	78,58 ^a	66,73 ^a	55,31 ^a
Cloreto de Benzalcônio 30%			
Média	38	34,5	44,83
Desvio padrão	11,52	10,83	5,81
%	78,99 ^a	80,72 ^a	81,13 ^a

Colunas com letras diferentes diferem significativamente entre si (p>0,05).

Tabela 2. Número médio com desvio padrão e percentual médio de larvas L₃ vivas de *Ancylostoma spp*. submetidos aos tratamentos com hipoclorito de sódio 100%, hipoclorito de sódio 50%, hipoclorito de sódio 25% e hipoclorito de sódio 12,5% durante as avaliações.

Grupos	Minutos após o desafio		
	10 min	30 min	60min
Controle			
Média	9,83	11,16	12,16
Desvio padrão	4,21	4,21	5,03
%	83,80 ^a	95,14 ^a	96,94 ^a
Hipoclorito de sódio 100%			
Média	0	0	0
Desvio padrão	0	0	0
%	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Hipoclorito de sódio 50%			
Média	2,166	0	0
Desvio padrão	2,48	0	0
%	16,09 ^b	0 ^b	0 ^b
Hipoclorito de sódio 25%			
Média	15,66	1,66	0
Desvio padrão	12,67	1,03	0
%	87,85 ^a	19,03 ^b	0 ^b
Hipoclorito de sódio 12,5%			
Media	9	10,16	9
Desvio padrão	5,21	3,43	6,26
%	76,12 ^a	87,92 ^a	76,12 ^a

Colunas com letras diferentes diferem significativamente entre si (p>0,05)..

eficácia em ovos de casca espessa como do *T. canis*.

Massara et al. (2003) não obteve um resultado satisfatório na inibição do desenvolvimento embrionário nos ovos de *Ascaris lumbricoides* na utilização de soluto de formaldeído, enquanto no presente estudo o formaldeído 7,99% e hipoclorito de sódio a 25% obtiveram total letalidade após um hora do desafio e diferiu significativamente, provavelmente tal resultado foi devido se tratar de formas evolutivas diferentes, favorecendo um ação contrária.

CONCLUSÃO

O hipoclorito de sódio 100% foi altamente eficaz na eliminação de larva de terceiro estágio de *Ancylostoma spp*. imediatamente após o tratamento em 10 minutos. Enquanto que o álcool 70% e o hipoclorito de sódio 50% obtiveram total letalidade das larvas vivas em 30 minutos e com 1 hora após o desafio hipoclorito de sódio 25% e formaldeído 7,99% em 24 horas obteve a eficácia plena. Os demais tratamentos não demonstraram um percentual de mortalidade larvar satisfatório em nenhum dos tempos avaliados. Estes resultados mostram, também, a necessidade de se reavaliarem os procedimentos de descontaminação de ambientes quando se tem por objetivo prevenir a infecção por larva L3 de *Ancylostoma spp*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balassiano B.C.C. *Fatores associados à infecção natural de cães por parasitos gastrintestinais*. Tese (Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007. 61p. (Disponível em: <http://r1.ufrj.br/wp/ppgc/category/teses_menu/>.)
- Freitas M.G. *Helminologia veterinária*. 6ª Ed. Precisa Editora Gráfica, Belo Horizonte, 1982. 396p.
- Gordon H.M.C.L. & Whitlock H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Commonwealth Sci. Ind. Org.*, 12:50-52, 1939.
- Massara C.L., Ferreira R.S., Andrade L.D., Guerra H.L. & Carvalho O.S. Atividade de detergentes e desinfetantes sobre a evolução dos ovos de *Ascaris lumbricóide*. *Cad. Saude Pub.*, 19:335-340, 2003.
- Morrondo P., Díez-Morrondo C., Pedreira J., Díez-Baños N., Sánchez-Andrade R., Paz-Silva A. & Díez-Baños P. *Toxocara canis* larvae viability after disinfectant-exposition. *Parasitol. Res.*, 99:558-561, 2006.
- Oshima T. Standarization of Techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migration routes of larvae. *J. Parasitol.*, 47:657-660, 1961.
- Stoye M. Untersuchung uber die möglichkeit pranataler und galaktogener infektionen mit *Ancylostoma caninum* (Erculani, 1859) (Ancylostomidae) bein hunde. *Zbl. Vet Med.*, B, 20:1-39, 1973.

Tavares P.V. *Ação de diferentes desinfetantes na viabilidade e desenvolvimento de ovos e na migração larvar de Toxocara cati (Schrank, 1788) em camundongos*. Dissertação (Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011. 38p. (Disponível em: <http://r1.ufrj.br/wp/ppgcv/category/teses_menu/>)

Verocai G.G., Tavares P.V., Ribeiro, F.A., Correia T.R. & Scott F.B. Effects of disinfectants on *Toxocara canis* embryogenesis and larval establishment in mice tissues. *Zoonoses Public Health*, 57:213-216, 2010.

Zar J.H. *Biostatistical Analysis*. 4th ed, Prentice Hall, New Jersey, 1999.