



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Risco de contaminação do solo por *Toxocara* spp na cidade
da Praia, Ilha de Santiago – Cabo Verde: Estudo Piloto**

Veronique Semedo da Veiga

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA MÉDICA

Novembro, 2024



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Risco de contaminação do solo por *Toxocara* spp na cidade
da Praia, Ilha de Santiago – Cabo Verde: Estudo Piloto**

Veronique Semedo da Veiga

Orientadora: Professora Doutora Manuela Calado

Coorientador: Professor Doutor Pedro Ferreira

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em
parasitologia Médica

Agradecimento

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida, saúde, coragem e determinação por ter acompanhado sempre nos meus estudos.

Um agradecimento especial aos meus pais Remígio e Isabel a quem dedico esse trabalho, este que ajudaram me financeiramente e emocionalmente. Aos meus irmãos, filho e a esposa pelo apoio durante toda a trajetória da minha vida.

Ao meu coorientador Professor Doutor Pedro Ferreira e a Professora Doutora Isabel Maurício, pelos ensinamentos de algumas técnicas. Um especial agradecimento a orientadora professora Doutora Manuela Calado, pelo apoio incondicional, paciência e espírito crítico científico ao longo da realização deste trabalho.

A Unidade de Helminologia e Malacologia Medica do IHMT, pela disposição dos meios para realização do estudo. Ainda agradeço a Professora Doutora Silvana Belo pela elaboração da carta de autorização na realização deste trabalho. Ao Instituto Nacional de Saúde Publica de Cabo Verde (INSP) em especial a Sra. Presidente Maria da Luz Neves e a Dr^a. Silvania Leal, pela autorização e disponibilidade do laboratório para realização do estudo. Ainda agradeço todos os técnicos do laboratório pelo imenso apoio e colaboração de uma forma consciente para que esta pesquisa seja realizada.

Agradeço a Universidade e a Coordenadora do Mestrado em Parasitologia Medica (MPM) Professora Doutora Carla Sousa pela vaga e oportunidade que disponibilizaram me para realização desse curso.

Aos colegas do curso Mestrado em Parasitologia Médica, em especial Evanilda Veiga, Sónia Cunha pelo incentivo e pelos momentos compartilhados desde o início desta jornada, onde juntos aprendemos lição que ficarão marcada para sempre.

Resumo

A toxocarose é considerada uma das zoonoses parasitárias mais comuns no mundo, tendo como ciclo de transmissão ao homem, o contacto com as terras e areias dos espaços públicos contaminados pelas fezes dos animais “errantes” e domésticos não desparasitados. A infeção nos humanos é causada por nemátodes do género *Toxocara* originando algumas complicações tais como: “larva migrante cutânea” e “larva migrante visceral”. Assim, os humanos contaminam-se através da ingestão de alimentos contaminados contendo ovos do parasita, e também através das práticas de onicofagia (hábito de roer as unhas) e geofagia (comer terra) lembrando que neste último caso, são em especial as crianças que são mais vulneráveis. De acordo com os dados publicados no Relatório Estatístico e no Ministério de Saúde de Cabo Verde até o momento não existe informação em relação à toxocarose. Assim, desenvolveu-se um estudo com o objetivo de avaliar a prevalência dos ovos da *Toxocara* spp no solo dos parques urbanos e jardins públicos da Cidade da Praia- Cabo Verde. Foram colhidas 160 amostras, das quais 20 foram amostras de fezes e 140 amostras de terras. Das 8 zonas escolhidas para o estudo, foram selecionados 5 pontos de amostragem dentro de cada zona. Os resultados mostraram que o número maior das amostras foi colhido em Fonton, com um total de 28 amostras, o que equivale 17,9%. Relativamente, à exposição solar dos pontos de amostragem, colheram-se 135 amostras em solo ensolarado e 25 em solo sombrio. No que respeita às características do solo, colheram-se 124 (77,5%) amostras em solo arenoso e 36 (22,5%) em solo húmido, a maioria (135; 84,3%) colhidos em solo ensolarado, das quais 61,8% foram negativas. Relativamente ao local de colheita, a maioria dos locais apresentava presença dos animais. No exame parasitológico das amostras das fezes, obteve-se 16 amostras negativas e 4 amostras positivas para ovos de *Toxocara* spp, enquanto para as amostras de terras, 134 foram negativas e 6 positivas, com larvas de *Toxocara* e outros Ancylostomídeos.

O diagnóstico molecular, confirmou uma maior sensibilidade que o exame parasitológico, pois foi possível obter-se mais 3 amostras positivas de terras para *Toxocara canis*, além das que foram obtidas nos exames parasitológicos. Também para as fezes, para além das 5 amostras positivas obtidas no exame parasitológico, foi possível obter-se mais 2 amostras positivas para *Toxocara canis* através do diagnóstico molecular. Com os resultados obtidos, ainda que preliminares, podemos constatar a existência de contaminação nos espaços públicos que são frequentados por animais errantes, e daí a necessidade de serem implementadas medidas de controlo, para evitar a contaminação destes espaços, frequentados pela população.

Palavras-chave: *Toxocarose, Toxocara, Prevalência, Cidade da Praia Cabo Verde.*

Abstract

Toxocariasis is considered one of the most common parasitic zoonoses in the world, with a transmission cycle that involves contact with soil and sand in public spaces, contaminated with the feces of stray and non-dewormed domestic animals. In this way, human infection is caused by nematodes of the genus *Toxocara*, leading to complications such as *cutaneous larva migrans* and *visceral larva migrans*. Humans become infected primarily by ingesting contaminated food containing parasite eggs, through the habit of nail-biting, and through geophagy (eating soil). Children are particularly vulnerable due to their frequent practice.

According to data published in the Statistical Report and by the Ministry of Health of Cape Verde, there is currently no information regarding toxocariasis or contamination of public spaces with *Toxocara*. Therefore, the objective of the study was to assess the prevalence of *Toxocara spp.* eggs in the soil of urban parks and public gardens in the city of Praia, Cape Verde. A total of 160 samples were analyzed, 20 fecal samples and 140 representing soil samples. Laboratory analysis was conducted using the egg concentration technique (Willis' method) and the Baerman and Brug technique for larvae observation. For molecular tests, PCR technique was used. The results indicated that the highest number of samples was collected in Fonton, totaling 28 samples, representing 17.9% of the total. Regarding the solar exposure of the sampling sites, 135 samples were collected from sun-exposed soils, while 25 were gathered from shaded soils. Concerning soil characteristics, 124 samples (77.5%) were taken from sandy soils, and 36 samples (22.5%) from moist soils. The majority (135; 84.3%) of the samples were obtained from sun-exposed soils, of which 61.8% tested negative. In terms of collection sites, most locations showed evidence of animal presence. Parasitological examination revealed that of the 16 fecal negative and 4 were positive for *Toxocara spp.* eggs, while of the soil samples, 134 were negative and 6 were positive for *Toxocara* and *hookworm* larvae. Molecular tests revealed 4 positive results for *Toxocara canis* in the fecal samples, while the soil samples tested negative. These findings demonstrated the contamination in public spaces and certain playgrounds in the city of Praia, highlighting the need to implement preventive measures against toxocariasis and public space contamination in areas accessed by the general population.

Key words: Toxocariasis, Prevalence, Praia City, Cape Verde.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADN: Acido Desoxirribonucleico
ADP: Adenosina difosfato
ALT: Alanina transaminase
ATP: Adenosina trifosfato
CDC: Centro do controlo e prevenção das doenças
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA: Food and Drug Administration
GABA: Acido gama-aminobutírico
IgE: Imunoglobulinas E
IgG: Imunoglobulinas G
IgM: Imunoglobulinas M
IHMT: Instituto de higiene medicina tropical
INE: Instituto nacional de estatística
INPS: Instituto nacional de saúde pública
ITS: Internal transcribed spacer
L1: Larvas em 1º estágio
L2: Larvas em 2º estágio
L3: Larvas em 3º estágio
LCR: Líquido cefalorraquidiano
LMO: Larva migrante ocular
LMV: Larva migrante visceral
NAchR: Recetores nicotínicos do acetilcolina
NT: Neurotoxocarose
OMS: Organização Mundial da Saúde
PCR: Reação da Cadeia Polimerase
Reação em cadeia de polimerase
Bp: pares de base
SNC: Sistema Nervoso Central
T. canis: *Toxocara canis*
T. cati: *Toxocara cati*
ZCIT: Zona convergência intertropical
ZEE: Zona económica exclusiva

Índice de Figuras

Figura 1: Animais envolvidos no ciclo da transmissão dos agentes causadores das zoonoses por helmintas (Fotos do Autor).	14
Figura 2: Representação dos alelos cervical da extremidade posterior de <i>T. canis</i> (A) e alelos cervical da extremidade posterior de <i>T. cati</i> (B) e os seus ovos (C) (Adaptado de Soares; 2005).	16
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Toxocara</i> spp.....	18
Figura 4: Possíveis fontes de contaminação por larvas e ovos de <i>Toxocara</i> e outros helmintas. (A e B) - Parque infantil São Pedro; C- zona piscatória da praia de Gamboa; D- área domiciliar na zona de Fonton (Fotos do Autor).	21
Figura 5: Mapa de Cabo Verde, ilha de Santiago Cidade da Praia	37
Figura 6: Esquema dos locais de colheita em cada espaço (Santarém et al., 2004 e Hernández., 2003).....	38
Figura 7: Técnica do Willis para observação dos ovos	39
Figura 8: A Técnica do Baerman e Brug para o diagnóstico	40
Figura 9: Locais da colheita de amostras em solo húmida. A- Zona Fonton – horta urbana B – Zona Taity – horta urbana, (Fotos do Autor).	47
Figura 10: Locais da colheita de amostras em solo arenoso.....	48
Figura 11: Locais da colheita de amostras em solo arenoso.....	48
Figura 12: Locais da colheita das amostras em solo ensolarado	48
Figura 13: Locais de colheita de amostras em solo sombrio	49
Figura 14: Presença de animais no local de colheita Fonton A- Parque infantil, B- horta domiciliar (Fotos do Autor)	50
Figura 15: Presença dos animais no local de colheita: A-Praia de Gamboa zona piscatória B- praia Gamboa (Fotos de Autor)	50
Figura 16: (A e B) presença das larvas de <i>Toxocara</i> spp nas amostras das terras	51
Figura 17: A- Ovos embrionados de <i>T. canis</i> em amostras de fezes em hortas urbanas de Fonton B- ovos não embrionados de <i>T. canis</i> em amostras de fezes da zona de São Pedro (Fotos do Autor).....	52
Figura 18: (A) Ovos de <i>T. canis</i> em amostras de fezes no parque infantil na zona de São Pedro (Fotos do Autor).	53
Figura 19: Presença dos ovos de nematodes em amostras de fezes na zona de Fonton (Fotos do Autor).....	53
Figura 20: Resultado da PCR para as amostras de terras para a região COI visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etidium, que amplificaram fragmentos com aproximadamente 500pb. M- marcador de peso molecular; C+- Controlo positivo.	54
Figura 21: Resultado da PCR em amostras de fezes para a região COI visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com <i>brometo de ethidium</i> , que amplificaram fragmentos com aproximadamente 500pb. M- marcador de peso molecular: C+- Controlo positivo.	54

Figura 22: Árvore filogenética com as sequencias de várias amostras de *T. canis* (amostras de Cabo verde) e as sequências homólogas disponíveis no GenBank para o gene COI, apresentando uma similaridade > 98%..... 57

Índice de Tabela

Tabela 1: Tabela 1:Distribuição da zona de colheita e tipo de amostra.....	44
Tabela 2: Tabela 2: Locais de amostragem e respetivo número de amostras	45
Tabela 3: Exposição solar dos locais de colheita e o número de amostras colhidas	46
Tabela 4: Tipo de solo nos locais de colheita	47
Tabela 5: Presença e ausência dos animais de acordo com os locais de colheita.....	49
Tabela 6: Tabela 7: Resultado das amostras das terras por zonas de colheita.....	51
Tabela 7: Resultado das amostras de fezes por zonas de colheita	52
Tabela 8: Resultados positivo representando percentagens das amostras das terras através da técnica de Baerman e PCR	55
Tabela 9: Resultados positivo representando percentagens das amostras das fezes através da técnica do PCR e exame parasitológico.....	56

Índice de Gráfico

Gráfico 1: Número de amostras colhidas por local de amostragem	46
--	----

Índice

Resumo.....	ii
Abstract	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	iv
Capítulo I - Introdução.....	13
1.1 Revisão Bibliográfica.....	13
1.2. Taxonomia e Morfologia.....	15
1.2.1.-Gênero <i>Toxocara</i> spp.....	15
1.2.2. Morfologia	15
1.3 Breves noções sobre <i>Toxocara canis</i> e <i>Toxocara cati</i>	16
1.3.1 <i>Toxocara canis</i>	16
1.3.2 <i>Toxocara cati</i>	17
1.3.3 Distribuição geográfica	17
1.3.4. Ciclo de vida	17
1.4 Caracterização da infecção por <i>Toxocara canis</i> no hospedeiro definitivo	18
1.5 Caracterização da infecção por <i>Toxocara cati</i> no hospedeiro definitivo	20
1.6 Características da infecção por <i>Toxocara</i> spp no hospedeiro paratênico humano.....	21
1.7 Ciclo biológico no solo	22
1.8 Patogenia e sinais clínicos nos hospedeiros definitivos	23
1.9 Toxocarose no Homem	23
1.10 Patogenia e sinais clínicos no homem.....	24
1.11 Toxocarose ocular	25
1.12 Diagnóstico Clínico da Toxocarose	25
1.13 Diagnóstico do <i>Toxocara</i> spp no homem.....	26
1.14 Diagnóstico Molecular	28
1.15. Tratamento da toxocarose	28
1.15.1. No hospedeiro humano:	29

1.15.2. No hospedeiro definitivo	30
1.16. Medidas do controlo ambiental:	31
1.17. Situação epidemiológica da Toxocarose em Cabo Verde	32
2.1. Objetivo do estudo	34
2.2. Objetivo Geral	34
2.3. Objetivos específicos	34
Capítulo III: Materiais e Métodos	36
3.1. Tipo de Estudo	36
3.1.1 Enquadramento geográfico da área do estudo em Cabo Verde.....	36
3.2. Local e período de estudo	37
3.3 Colheitas das amostras de fezes e de terras.....	37
3.4. Diagnóstico Laboratorial das amostras das terras e fezes (INPS).....	38
3.4.1. Diagnóstico parasitológico das amostras de fezes usando a técnica de Willis.....	39
3.4.2 Diagnóstico das formas larvares nas amostras das terras usando técnica de Baerman e Brug.....	39
3.4.3 Diagnóstico molecular realizadas no laboratório do (IHMT)	40
3.4.3.1. Extração de DNA	40
3.4.3.2. Amplificação do DNA genómico	41
3.4.3.3 Sequenciação do DNA genómico e análise molecular	42
Capítulo IV. Resultados	44
4.1. Locais de colheita e quantidade das amostras	44
4.2. Exposição solar dos locais de colheita	46
4.2.1 Local de colheita e presença de animais	49
4.2.2 Exame das terras - Técnica de Baerman e Brug.....	50
4.2.3 Exame parasitológico das fezes - Técnica de Willis	51
4.3. Análise molecular	53
4.3.2. Sequenciação e análise filogenética	56
Capítulo V. Discussão e Conclusões	58

5.1. Discussão	59
5.2 Conclusão.....	63
6. Referencias bibliográficas	63
7. Anexos	72
7.1. Materiais.....	72
7.1. Reagentes	73

Capítulo I: Introdução

Capítulo I - Introdução

1.1. Revisão Bibliográfica

As espécies do género *Toxocara* são nemátodes que parasitam o intestino dos animais selvagens e domésticos principalmente cães e gatos, nos quais as suas formas adultas libertam ovos no meio ambiente através das fezes dos animais infetados. O período de embrionamento e de desenvolvimento até ao estágio de L2-L3 (forma infetante) está dependente das condições do meio ambiente, nomeadamente da temperatura (Peixoto, 2018). Estes ao serem ingeridos pelos hospedeiros podem causar infeções nos animais domésticos, e animais errantes assim como, em humanos, causando toxocarose humana, originando várias síndromes tais como, Síndrome da Larva Migrante Visceral (LMV), Larva Migrante Neurológica (LMN) e Larva Migrante Ocular (LMO), (Peixoto, 2018).

As espécies mais conhecidas são *Toxocara canis* e *Toxocara cati*. (Otero & colaboradores *et al.*, 2015). No homem, a infeção por *Toxocara* spp ocorre de forma ocasional, quando este ingere acidentalmente os ovos contendo a forma infetante – larvas L3. Os ovos podem ser encontrados no solo, nos alimentos ou objetos que estejam contaminados com fezes dos animais parasitados. (Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2007). Os hospedeiros definitivos (cães e gatos) adquirem a infeção através do contacto e ingestão dos ovos contendo as formas infetantes nas fezes dos animais infetados em espaços públicos e áreas de recreação (Virgens, 2015). As infeções são adquiridas pelas vias galactogénica e transplacentária e, com menos frequência, pela ingestão dos tecidos dos hospedeiros paraténicos que contém larvas do *T. canis* encapsuladas nos músculos (Glickman & Schantz, 1981). Em 1950, Wilder fez o diagnóstico da infeção por *Toxocara* spp., através da identificação do granuloma fixado nos olhos de uma criança (Castelo, Dinis & Rocha, 2008). De acordo com o estado da doença, a infeção no homem pode apresentar diversos aspetos clínicos, nomeadamente, LMV, LMO e as formas subclínicas e assintomáticas (Castelo, Dinis & Rocha, 2008). Os espaços públicos são considerados ambientes propícios para a presença desses parasitas, devido a circulação de cães e gatos. Estes locais de lazer são frequentados, por enormes quantidades de pessoas, principalmente por

crianças, que são mais vulneráveis a possíveis infecções parasitárias. A contaminação do solo com os ovos de *Toxocara* e *Ancylostoma* spp., parece ser um importante fator de risco que favorece a origem da infecção por estes nemátodes, causando a Síndrome de LMV e a Síndrome de LMC (Santarém *et. al* 2009).

Assim, o risco da contaminação é maior em crianças, devido ao contacto direto com as terras contaminadas com fezes contendo ovos do género *Toxocara* através das brincadeiras e geofagia (Lewis, 2006). A relação entre o homem e os animais de companhia, em especial cães e gatos, demonstra ter uma grande importância na sociedade, pois ao proporcionar companhia e bem-estar está também a contribuir para o desenvolvimento físico, social e emocional nomeadamente das crianças e idosos (Taira, *et al.*, 2004). No entanto, estes dispõem de parasitas capazes de transmitir a infecção de uma forma direta ou indiretamente aos humanos. As infecções zoonóticas são causadas por diversos microrganismos incluindo os parasitas (Rey, 1992), caso não seja tida em consideração, o cuidado a ter com a saúde dos animais (**Figura 1**).



Figura 1: Animais envolvidos no ciclo da transmissão dos agentes causadores das zoonoses por helmintas (Fotos do Autor).

As zoonoses parasitárias são uma das infecções com maior prevalência global (Merigueti *et al.*, 2017) e geralmente estão relacionadas com a presença dos animais em locais frequentados por humanos, tal como encontra representado na **Figura 1** (Marques *et al.*, 2012). Esses parasitas tem um efeito adverso na saúde e bem-estar dos seres humanos,

comprometendo o seu sistema imunológico e resultando em doenças agudas ou crônicas (OMS, 2020).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2020), a toxocarose é considerada uma das principais doenças parasitárias com elevada importância em saúde pública, uma vez que é uma zoonose causada por helmintas das espécies *T. canis* e *T. cati*, e tendo como os hospedeiros definitivos cão e o gato (Ma *et al.*, 2018; Magnaval *et al.*, 2001). A infecção em humanos ocorre de uma forma direta, e acidental através da ingestão dos ovos pela via fecal- oral. O indivíduo atua como hospedeiro parasitário, onde o ciclo não se completa (Fakhri *et al.*, 2018; Rubinsky-Elefant *et al.*, 2010).

1.2. Taxonomia e Morfologia

1.2.1.-Gênero *Toxocara* spp

Reino – ANIMALIA

Filo – NEMATODE

Classe – PHASMIDIA

Ordem – ASCARIDIDIA

Superfamília – ASCADIDOIDEA

Família – ASCARIDIDAE

Gênero – *Toxocara*

Espécie – *Toxocara canis*, (Werner, 1782)

Toxocara cati (Zeder, 1800)

1.2.2. Morfologia

As espécies pertencentes ao gênero *Toxocara* spp são parasitas que colonizam o tubo digestivo dos cães domésticos, gatos e cães errantes. Possuem coloração branca e destacam-se pela falta de segmentação corporal e pela presença de um sistema digestivo completo (Neto, 2011). Os machos destas espécies conseguem atingir dimensões entre 4 a 6 cm e exibem dimorfismo sexual, sendo facilmente reconhecidos pela presença de uma extremidade masculina com encurvamento ventral posterior. Ao microscópio os ovos desses parasitas são observados com uma coloração castanho-escuro e apresenta uma casca densa com escavações, com dimensões de aproximadamente 80 µm de

comprimento e 75 µm de largura; (Neto, 2011). De acordo com Pando (2015) e Foreyt (2001), os vermes adultos, são dioicos, com o corpo alongado, não segmentado, cuja extremidade anterior apresenta três lábios e duas asas cervicais. As fêmeas possuem comprimento variando entre 5-18 cm, enquanto os machos possuem dimensões de 4-10 cm. Adicionalmente, os machos possuem um apêndice digitiforme na extremidade posterior. Os adultos da espécie *T. canis* apresentam na sua extremidade anterior, estrutura em forma de boca composta por três lábios, um dorsal e dois subventrais, como se pode observar na **Figura 2**, cuja característica permite diferenciar não só dentro do género *Toxocara*, mas de todos outros nemátodes da mesma ordem. (Bowman, 2014).

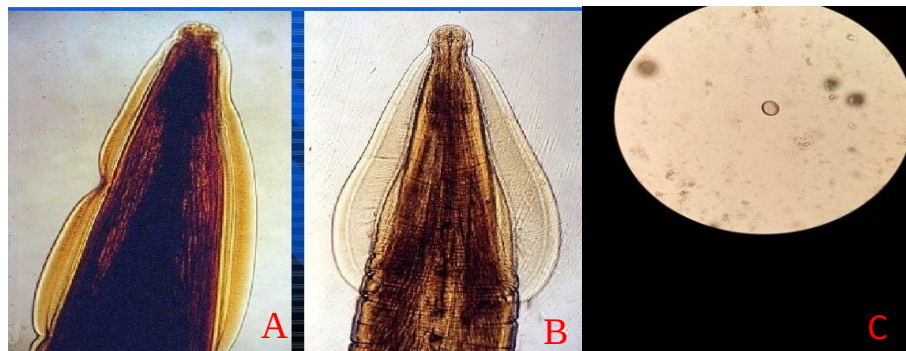


Figura 2: Representação dos alelos cervical da extremidade posterior de *T. canis* (A) e alelos cervical da extremidade posterior de *T. cati* (B) e os seus ovos (C) (Adaptado de Soares; 2005).

1.3. Breves noções sobre *Toxocara canis* e *Toxocara cati*

1.3.1. *Toxocara canis*

Existe pouca informação na literatura científica sobre a identificação e descrição de *T. canis*. Inicialmente, Werner (1782) descreveu essa espécie como *Lumbricus canis*, com base na análise de amostras encontradas em cães. Posteriormente, esta foi identificada como *Ascaris canis*. Mais tarde, em 1900, Dr. A. Leiper estabeleceu o género *Toxocara* e nomeou *A. canis* como a espécie Padrão do género, levando a sua renomeação como *T. canis* (Neto, et., al 2011).

1.3.2. *Toxocara cati*

Em 1782, Goeze descreveu o parasita encontrado no gato que possuía grandes alelos cervicais. Posteriormente, Schrank (1788) deu a esse parasita o nome de *Ascaris cati*. Mais tarde, Zeder (1800) deu ao parasita o epíteto específico *mystax*. No entanto, o nome anteriormente proposto por Schrank em 1788, prevaleceu sobre o nome sugerido por Zeder. Stiles e Hassal (1905) estabeleceram o género *Toxocara*. Dois anos depois, em 1907, Leiper estabeleceu o género *Belascaris*, que se distinguiu dos ascarídeos por ter o ventrículo localizado na base do esófago do parasita. A representação deste género foi atribuída a *Ascaris mystax* pelo autor. Em 1924, Stiles e Brown fizeram uma confirmação taxonómica onde foi definida a relevância do género *Toxocara* em comparação com *Belascaris*, e sugeriram o nome *Toxocara mystax* para o nemátodes felinos. Depois o epíteto específico “cati” foi escolhido posteriormente em homenagem a “mystax” levando a padronização da espécie como *T. cati* (Neto. *et. al* 2011).

1.3.3. Distribuição geográfica

A toxocarose é reconhecida como uma parasitose de ampla distribuição global. Sua prevalência varia de acordo com cada região. tendo sido registada uma prevalência média de 54% de infeção em cães nomeadamente países da União Europeia, América do Norte e na Ásia. No entanto, nota-se que cada animal parasitado em média pode produzir 200.000 ovos diariamente nas fezes por cada fêmea adulta do parasita. Esta produção é reduzida no vigésimo oitavo dia após a infeção (Rey, 2008). *T. canis* e *T. cati* são nemátodes identificados em várias regiões do mundo, no qual os hospedeiros definitivos incluem cães, gato raposa, lobo e outros canídeos selvagens. Além disso, podem parasitar outros hospedeiros paraténicos, como aves e roedores (Pirão, *et al.*, 2018).

1.3.4. Ciclo de vida

Os nemátodes adultos alojam-se no canal digestivo dos hospedeiros definitivos, como cães e gatos, onde as fêmeas produzem grandes quantidades dos ovos, que são posteriormente eliminados nas fezes para o meio ambiente (Araújo, 1972). Os ovos, que contém o embrião unicelular, são eliminados nas fezes, contudo, nessas circunstâncias

não são capazes de provocar a infecção por isso, o processo de embriogénese pode levar 3 a 6 semanas para que o embrião seja infetante (Overgaaauw, 1997b). Durante este período, os ovos acumulam-se no solo, e sob condições ótimas de temperaturas, humidade e pressão de oxigénio, o embrião desenvolve-se vários estádios larvares (L1 e L2) até atingirem a forma infetante, L3 (Araújo, 1972; Zajac & Conboy, 2012). O ciclo desse parasita inclui diversas etapas: a fase em que o parasita desenvolve nos hospedeiros definitivos (o cão e o gato); a disseminação do parasita aos humanos (que servem como hospedeiros paraténicos) e a contaminação do solo com ovos, que contem embrião capaz de induzir a infecção (Rey 2008) (**Figura 3**).

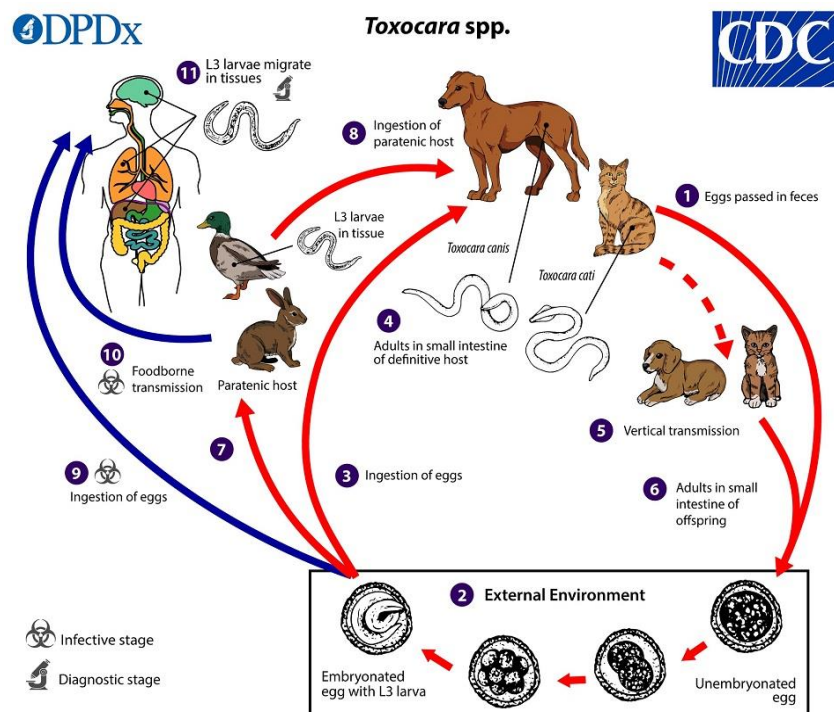


Figura 3: Ciclo de vida de *Toxocara* spp

(Adaptado de Centro do Controlo de Doença e Prevenção de Parasitas).

1.4. Caracterização da infecção por *Toxocara canis* no hospedeiro definitivo

Os cães, assim como os animais selvagens, lobos e raposas, são designados hospedeiros definitivos do *T. canis*. Contudo, os cães domésticos destacam-se como hospedeiros mais relevantes, devido ao seu contato próximo com seres humano e a grande população dos cães existente. (Virgens, 2015). Esses animais são infetados através da ingestão dos ovos

provenientes das fezes dos outros animais contaminados em locais como praças, praias, áreas de recreação, jardins infantis e parques públicos, **(Figura 3)** (Capuano *et al.*, 2006).

Além disso, os cães podem contrair a infecção através de diversas outras vias, tais como, a via transplacentária, transmamária e, em menor grau, através da ingestão dos tecidos dos outros hospedeiros que contêm larvas encapsuladas de *T. canis* (Glickman & Schantz, 1981; Overgaauw *et al.*, 1997) **(Figura 3)**. Depois de serem ingeridos pelo cão, os ovos com as larvas L2 através da ação do suco gástrico, as larvas eclodem no intestino. Estas penetram a parede do intestino e alcançam a corrente sanguínea e através da veia porta ou vasos linfáticos migram para órgãos como fígado, coração e pulmões. Nas vias respiratórias, as larvas provocam roturas nos bronquíolos, atingindo a traqueia, onde são ingeridas, iniciando o processo da secreção da tosse, regressando ao intestino delgado. No canal digestivo do cão, o parasita evolui para forma adulta adquirindo a habilidade de produzir ovos todos os dias. A conclusão deste ciclo leva 3 a 4 semanas. Em condições favoráveis, os ovos tornam-se infetantes na superfície externa em um intervalo que oscila entre 2 e 5 semanas (Santarém *et al.*, 2009). Um aspeto importante no ciclo de vida destes parasitas, é que as larvas possuem capacidades de entrarem em estado de hipobiose, permanecendo nos tecidos e vísceras dos animais infetados em estado latente, mesmo depois da sua desparasitação (Santarém *et al.*, 2009) **(Figura 3)**.

Em algumas situações específicas, como exemplo alterações hormonais e modificações metabólicas durante a gravidez, as larvas encapsuladas nos tecidos maternos são reativadas, passando através da placenta para infetar o feto, também chegam à glândula mamária para infetar os neonatos por meio da amamentação (Urquhart *et al.*, 1996; Regis *et al.*, 2011). Os cães com 30 dias de vida são os mais suscetíveis a infecções digestivas, de acordo com Rey, 2008. Normalmente, a incidência dos parasitas adultos é maior em cães machos, do que em fêmeas, na quais predominam as formas larvares L2 enquistadas (Vieira, 1978). Nos cães adultos, à medida que envelhecem, os parasitas migram dos pulmões até o coração onde permanecem em estado latente, podendo persistir por um período prolongado. A infecção pré-natal acontece quando a migração das formas larvares penetra na placenta. A infecção, acontece aproximadamente aos 42 dias de gestação devido à migração das larvas que se encontra nos tecidos dos animais. A circulação do parasita está ligada a mudanças hormonais durante a gravidez (Rey; 2008)

1.5. Caracterização da infecção por *Toxocara cati* no hospedeiro definitivo

Os parasitas da espécie *T. cati*, são ascarídeos de menores dimensões que *T. canis*, medindo os machos entre 3-6 cm, enquanto as fêmeas entre 4-10 cm e estas últimas apresentando alelos cervicais mais largos. Os ovos das duas espécies apresentam uma morfologia semelhante, porém os ovos *T. cati* são de menores dimensões (65-75µm). Relativamente ao seu ciclo biológico, nas condições ótimas, o embrião (larva) que se encontra dentro do ovo de *T. cati* eclode a partir da quarta semana (**Figura 3**) (Graça, 2015). Foram identificadas três formas de infecção por *T. cati* em gatos: pela ingestão dos ovos com larvas L3 (Epe, 2009), transmissão galactogénica e ingestão de hospedeiros paraténicos (Epe, 2009). Ao contrário do que acontece na infecção por *T. canis*, na infecção por *T. cati* não há infecção durante a primeira fase da gravidez. O tempo de incubação nas infecções causadas pelo *T. cati* é de 8 semanas (Epe, 2009; CAPC, 2012).

No entanto, tal como acontece com a espécie *T. canis* no cão, os gatos também são afetados quando ingerem ovos de *T. cati*. As larvas deslocam-se pela via traqueio-digestiva, passando pelas várias fases de desenvolvimento larvar, o que resulta na formação de vermes adultos no intestino e na excreção de ovos nas fezes, sendo detetados entre 6 e 8 semanas após a infecção (Graça, 2015). As crias lactantes podem contrair a infecção por meio da amamentação. A infecção em gatos é similar à infecção que ocorre nos cães, contudo, nos gatos não há transmissão placentária e a forma da migração traqueal continua alta ao longo da vida do animal (Otero *et. al* 2015).

A transmissão através da lactação, que possui pouca importância nos cães, é vista como a forma predominante de infecção em gatos recém-nascidos (Strube *et al.*, 2013). Considerando que os gatos são naturalmente predadores, as infecções causadas pela ingestão dos roedores e outros e animais considerados hospedeiros paraténicos também desempenham um papel crucial na propagação da doença. Da mesma forma que nos cães, o parasita nunca migra para o sistema somático e geralmente desenvolve-se até atingir maturidade sexual no intestino, sem necessidade de migração pela traqueia (Schmidt & Roberts, 2008; Bowman, 2014).

1.6. Características da infecção por *Toxocara* spp no hospedeiro paraténico humano.

As áreas públicas, frequentadas por pessoas e crianças são vistas como focos de contaminação por fezes de caninas e felinas, constituindo um importante foco de disseminação das infecções parasitárias (**Figura 4**). No entanto, com o crescimento expressivos de animais domésticos e errantes e com acesso a esses locais, o perigo ambiental e a exposição humana, particularmente de crianças, por zoonoses têm se aumentado (González & Cáceres *et. al.*, 2004; Blazius *et. al.*, 2005; Pedrassani *et. al.*, 2008).



Figura 4: Possíveis fontes de contaminação por larvas e ovos de *Toxocara* e outros helmintas. (A e B) - Parque infantil São Pedro; C- zona piscatória da praia de Gamboa; D- área domiciliar na zona de Fonton (Fotos do Autor).

Em relação ao ciclo destes parasitas, é crucial, ter em consideração, os hospedeiros paraténicos, onde a infecção acontece através da ingestão dos ovos que contém as formas infetantes e que são encontrados no solo (Vieira, 1978). Em caso da ausência, do estímulo

para diferenciação e morfogénese nestes hospedeiros, as larvas L2 não alcançam a fase adulta. Nos hospedeiros paraténicos, a larva mantém-se encapsulada nos músculos e entre outros tecidos, atuando como reservatório natural para infeção do hospedeiro definitivo, especialmente quando estes ingerem os tecidos infetados dos outros animais (Gillespie, 1987). O processo da libertação das larvas nos tecidos ocorre no momento da digestão, invadindo a mucosa do hospedeiro para assim continuarem o seu ciclo de vida. Alguns hospedeiros paraténicos de *T. canis* podem incluir anelídeos, baratas, pequenos roedores, aves, porcos, cordeiros e, entre outros, inclusive o próprio ser humano (Glickman & Schantz, 1981).

Os cães ao defecarem no meio ambiente, vão contaminar o solo com fezes que contém os ovos de *Toxocara*, os quais adquirem capacidade infetante no solo. Desta forma, o homem pode infetar-se pela via direta entra em contacto com fezes contaminadas ou por via indireta que ocorre pelo consumo accidental de água ou alimentos contaminados (Rey, 2008).

1.7. Ciclo biológico no solo

As condições ambientais adequadas como a temperatura atmosférica, a humidade, a pluviosidade e vegetação desempenham um papel essencial no desenvolvimento dos geohelminthas. O solo mais propício para o desenvolvimento dos ovos embrionados é do tipo argiloso. A faixa da temperatura ideal varia de 15°C a 35°C, pois abaixo dos 15°C os ovos entram em estado de dormência, impedindo seu desenvolvimento, enquanto acima dos 35°C ocorre desidratação dos ovos (Jacob *et.al.*, 1987 e Rey, 2008).

A presença de cães errantes e domésticos, pode contribuir para um aumento da contaminação dos espaços públicos frequentados principalmente por crianças e indivíduos que apresentam geofagia, cujo transtorno alimentar se caracteriza pela ingestão de terras contaminadas com ovos embrionados com as formas infetantes de *Toxocara* (Rey, 2008). A eliminação da grande quantidade dos ovos contribui significativamente para alta contaminação ambiental. Sob condições favoráveis, os ovos embrionados tornam-se infeciosos entre o 9º e 15º dia (Rey, 2008).

1.8. Patogenia e sinais clínicos nos hospedeiros definitivos

Normalmente não são observados sinais clínicos evidentes de parasitoses por ascarídeos em animais adultos (ESCCAP 2017). No entanto, em casos com uma a carga parasitária considerável, ou ainda em animais jovens ou imunodeprimidos, os sinais clínicos mais comuns podem incluir a apatia, perda de peso, anorexia, distensão abdominal, má qualidade da pelagem, tosse diarreia, obstipação e dor abdominal (Bowman *et al.* 2014; Taylor *et al.* 2016; CAPC2017).

As infecções por *T. canis* quando são leves, a fase migratória das larvas não causa danos significativos nos tecidos e os parasitas adultos não induzem reações graves no intestino (Taylor *et al.*, 2016). Contudo, em casos mais grave da infecção, a migração larvar na fase pulmonar pode estar relacionada com pneumonia e edema pulmonar (Taylor *et al.*, 2016), enquanto a fase intestinal pode levar desenvolvimento de uma enterite, obstrução intestinal (com possibilidade de ruptura do intestino seguida de peritonite) e obstrução do ducto pancreático e/ou hepático, potencialmente resultando na morte do cão (Bowman *et al.*, 2014; Taylor *et al.* 2016; ESCCAP 2017). Cães que passam por fases críticas da infecção podem-se recuperar completamente e expulsar os parasitas de seus intestinos nos primeiros 6 meses de vida (Urquhart *et al.*, 1996, Santarém *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2008). As infecções causadas por *T. cati*, e *T. canis*, podem ter grandes consequências para os seus hospedeiros, uma vez que as larvas têm a capacidade de fazer uma rápida migração pulmonar (Ray Dillon *et al.* 2013).

1.9. Toxocarose no Homem

Após a determinação da fisiopatogenia da toxocarose por Paul Beaver e colaboradores em 1952, a doença passou a ser denominada de síndrome LMV., atraindo atenção da comunidade científica (Sousa *et al.*, 2008). Outros nemátodes têm também a capacidade de produzir sinais clínicos semelhante à LMV em seres humanos, como é o caso do *Ancylostoma caninum* (Araújo *et al.*, 1999). Dessa forma, em 1969, Beaver, introduziu o conceito da Síndrome de LMV para descrever os casos caracterizados pela migração ativa e, principalmente pela persistência de larvas vivas por longos períodos em hospedeiros paratênico. Durante o tempo em que as larvas permanecem nos tecidos dos hospedeiros paratênicos, não ocorrem mudanças do estado larvar, e o parasita não atinge maturidade.

Porém, estas permanecem vivas e migram pelos órgãos internos. E assim que se desenvolve a fisiopatologia tanto da LMV quanto da LMO, segundo (Santarém *et al.*, 2009).

Do ponto de vista clínico, é observado predominantemente que as infecções são de natureza ligeira e frequentemente assintomáticas, apresentam como características a persistência da eosinofilia (Beaver, 1972), e uma elevada produção de IgE específica e policlonal. Entretanto, estas manifestações estão associadas a um processo de imunomodulação do hospedeiro (Virgens, 2015).

Nas apresentações clínicas sintomáticas, durante o processo de migração, pode ocorrer o desenvolvimento de hemorragia, necrose, inflamação eosinofílica e formações de granulomas. Nestes cenários, os sinais clínicos mais frequentes observados englobam alterações respiratórias e disfunção hepática, podendo culminar em quadros sistêmicos de hipersensibilidade. Estes sinais e sintomas são mais prevalentes em crianças com idade compreendidas entre os 2 e os 5 anos, sendo esta a faixa etária mais suscetível à toxocarose devido ao maior contacto com os solos e uma maior exposição à ingestão de ovos por geofagia (Robertson *et al.*, 2000; Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2007).

1.10. Patogenia e sinais clínicos no homem

Após a ingestão dos ovos embrionados ocorrem o processo da eclosão no intestino delgado, onde as larvas entram na circulação sanguínea, e através da via hepática migram para os diversos órgãos (Smith *et al.*, 2009)

Esse processo desencadeia uma série de alterações, incluindo aumento dos níveis de eosinófilos, elevada quantidade das globulinas séricas com altos títulos de IgG e IgM, hepatomegalia, hepatoesplenomegalia, formação dos nódulos nos órgãos e derrame pleural, bem como nódulos pulmonares ou hepáticos e pneumonia. Além disso é observado o aumento na concentração de IgE total, maior suscetibilidade a asma, leucocitose e anemia juntamente com ocorrência de hemorragia, necrose e inflamação eosinofílica (Schantz, 1989).

Existem casos de pleocitose e mielite, indicando alterações neurológicas que podem estar

associadas a vasculite cerebral, e bem como ocorrência de convulsões. Atualmente há um consenso sobre a classificação da toxocarose humana, no qual inclui várias síndromes (Despommier, 2003; Magnaval *et al.*, 2001b,). porém, deve se notar que a maioria das infecções são clinicamente assintomática.

1.11. Toxocarose ocular

Segundo Wilder, 1950 a toxocarose ocular foi descrita antes das outras complicações. Esta condição geralmente afeta crianças pequenas, adolescentes ou adultos jovens e é frequentemente unilateral. A presença de uma única larva na parede ocular tem a capacidade de induzir a inflamação crônica, sendo que a resposta imunológica ao Ag ES (antígeno excreção-secreção) liberado em uma área bastante confinada desempenha um papel crucial (Reis, 2008).

O desfecho patológico é a uveíte anterior ou, mais comumente, a uveíte posterior, em associação com hialite e coriorretinite. A turvação do humor vítreo pode ser concomitante depósitos de imunocomplexos, frequentemente localizado na periferia ("bolas de neve"), e com desenvolvimento de bandas de tração fibrosa e que culminam em descolamento de retina. Durante o período que a larva permanecer fixada nas membranas oculares devido as respostas, inflamatória, existe a possibilidade de desenvolvimento de um granuloma retiniano, frequentemente localizado no polo posterior do olho. Em casos de maior dimensão, este granuloma pode provocar um protuberância no polo posterior que se assemelha a um retinoblastoma (Balmer e Munier, 2007).

O sintoma inicial mais prevalente e deterioração da acuidade visual no olho comprometido, a qual frequentemente se intensifica rapidamente ao longo de dias ou semanas. Maioria dos pacientes apresentam infecção subclínica e são diagnosticados durante um exame oftalmológico de rotina (Good *et al.*, 2004).

1.12. Diagnóstico Clínico da Toxocarose

No caso dos cães, o diagnóstico é estabelecido através da análise parasitológica das fezes,

observando a presença dos ovos, arredondados e de coloração escura com a camada externa, não embrionados com cerca de 75x90 µm diâmetro (Overgaww & Van Knapen, 2008). O parasita adulto pode ser encontrado tanto em fezes quanto no vômito. A técnica de Willis, é a técnica mais adequada para a pesquisa de ovos de *Toxocara* spp nas fezes dos hospedeiros definitivos. Caso sejam amostras de solo, para a pesquisa de larvas, a técnica mais adequada é a de Baerman e as suas alterações, a qual se baseia na colocação de uma porção de amostra de terra em contacto com água aquecida a 45°C. Devido ao seu hidro e termotropismo as larvas de *Toxocara* mergulham na água, onde vão sedimentar (Rey, 2001) Durante o momento em que a larva encontra enquistadas nos tecidos e inativa sua migração, o exame fecal não é capaz de detetar a infecção. Deste modo, o diagnóstico é feito por meio de exames indiretos para detetar anticorpos circulantes específicos (Overgaww, 1997). Considerando alta produção dos ovos e uma menor densidade dos mesmos, o método mais adequado para o diagnóstico definitivo das infecções deste género é a técnica de flutuação. Nesta abordagem uma pequena percentagem de fezes (1-10g) são adicionadas a uma solução de flutuação de alta densidade e inseridos em um tubo de ensaio (ESCCAP 2017; CAPC 2017). Isto faz com que os ovos com densidade menor que a da solução de flutuação, subam à superfície da solução, enquanto os restos de fezes, com densidade superior à da solução, permanecerá no fundo do tubo. Para que esse processo se torna melhor e mais eficaz é recomendada a técnica de centrifugação para separação dos ovos e do restante material fecal (CAPC 2017).

Outra forma do diagnóstico que demonstra ser eficaz são os exames imunológicos permitindo usar os antígenos específicos para detecção dos ascarídeos nas fezes, com isso é possível identificar os antígenos dos nemátodes adultos presente no intestino delgado, dos hospedeiros possibilitando o diagnóstico de infecções que poderiam passar despercebidas, usando apenas a técnica de flutuação por exemplo, infecções causadas por estágio imaturo dos parasitas ou quando estejam presentes apenas os machos, resultando na ausência de produção dos ovos (CAPC 2017).

1.13. Diagnóstico do *Toxocara* spp no homem

Na realização de um diagnóstico da toxocarose em humanos, deve-se considerar os

seguintes fatores: a história clínica do doente, sinais e sintomas clínicos, exames moleculares e imunológicos positivos. A biópsia não é considerada um bom método para o diagnóstico (Gillespie, 1987). Sendo assim os exames imunológicos tornam-se o principal método diagnóstico para LMV e LMC.

A semelhança do que ocorre na fase de enquistamento das larvas no hospedeiro definitivo, o exame parasitológico das fezes não é aplicável em humanos, considerando que em hospedeiros paraténicos, o ciclo de vida não é concluído. o que significa que, estes hospedeiros não eliminam ovos nas fezes (Santarém *et al.*, 2008). As principais alterações observadas nos exames laboratoriais dos pacientes humanos com toxocarose incluem leucocitose, a maior parte devido à eosinofilia, e aumento das globulinas séricas correlacionado com os títulos elevados de IgG e IgM. Portanto, a sorologia representa o método de diagnóstico mais eficaz, detetando elevado níveis circulantes de imunoglobulinas anti-*T. canis* (Andrade, 2010). Em comparação com outros exames ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) é indicado como sendo o diagnóstico mais eficaz (Gillespie, 1987 e Magnaval *et al.*, 2001).

O teste de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), utilizando os antígenos de excreção-secreção das larvas L2, demonstra uma sensibilidade de 80 % e uma especificidade variando 90% e 95 %. A ocorrência dos resultados falsos-positivos é frequente, potencialmente associada a infeção de longa data, infeção recente ou casos de LMO (Jacquier *et al.*, 1991). Em situação de suspeita de LMO, é recomendada a obtenção de humor vítreo ou aquoso. Nestes fluidos os títulos de anticorpos anti-*Toxocara* tendem a ser mais elevado do que no soro (Brasseur *et al.*, 1984).

Além disso é importante considerar que reações cruzadas podem ocorrer em casos de infeções por parasitas como *Strongyloides*, *Trichinella* e *Fasciola* resultando em possível resultado falsos-positivos neste teste de diagnóstico (Jacquier *et al.*, 1991). Zarnowska e colaboradores (1995) constataram que os anticorpos do tipo IgE produzidos contra *Toxocara* estavam detetáveis em 54 % dos casos (De la Fe Rodriguez *et al.*, 2006).

Por outro lado, Obwaller e colaboradores (2004) observaram no seu estudo que os níveis de anticorpos do tipo IgG estavam associados a casos de LMV e não de LMO. Estes autores não encontraram diferenças entre casos assintomáticos e sintomáticos. Magnaval

(1987), reportou que em pessoas com sinais cutâneos de alergia causada por *Toxocara*, os elevados níveis de IgE eram mais frequentes que a eosinofilia (Pawlowski, 2001). Considerando-se assim que a detecção de IgE pode ser útil para o diagnóstico diferencial da toxocarose. O uso de técnicas imagiológicas permite detetar e localizar as lesões granulomatosas causadas pelas larvas L2 de *T. canis*. No caso de LMO, ultrassons revelam massas periféricas, membranas vítreas e descolamento da retina (Santarém *et al*, 2009).

1.14. Diagnóstico Molecular

Para o diagnóstico molecular o PCR é utilizado como um dos métodos de eleição para detecção do ADN do parasita em amostras biológicas humanas e dos animais usando os Primers que amplifica as regiões do rDNA nuclear e ribossomal, ITS-1 e ITS-2. Em seguida pode ser usada uma outra técnica que é a sequenciação que consiste na confirmação e a identificação das duas espécies e entre os demais nematodes ascarídeos. Em animais, esta técnica tem sido utilizada nas amostras de fezes dos animais para fazer identificação dos ovos do *T. canis* e *T. cati*, e também as larvas, enquanto nos humanos tem sido empregado nos fluidos biológicos e em tecidos quando ocorrem casos de biopsias (Oguz, *et al*, 2018).

1.15. Tratamento da toxocarose

Os agentes antiparasitários interferem na geração de energia e na coordenação neuromuscular dos parasitas, bem como na dinâmica dos microtúbulos, levando à morte do parasita por inanição. Nos helmintas, a energia é obtida principalmente através da fermentação anaeróbia dos hidratos de carbono, com a glicose a servir como substrato central para a produção energética. O tratamento com antiparasitários pode ainda alterar funções celulares fundamentais dos parasitas, como a inibição da polimerização da tubulina, afetando a estrutura e a função dos microtúbulos. A interferência na coordenação neuromuscular ocorre pela inibição de neurotransmissores excitatórios (por exemplo, a acetilcolina) ou inibitórios (como o ácido gama-aminobutírico, GABA). Estes fármacos atuam como agonistas de elevada afinidade sobre os canais de cloro seletivos, estimulando recetores pré-sinápticos de latrofilina ou interagindo com recetores

nicotínicos da acetilcolina (nAChR), presentes exclusivamente em nemátodes, o que resulta na paralisia espástica e flácida do parasita (Spinosa *et al.*, 2011).

1.15.1. No hospedeiro humano:

Vários estudos têm discutido sobre a questão da terapia na infecção por *Toxocara*, porém atualmente não há um consenso sobre o tema. A utilização do albendazol e mebendazol, aprovadas pelo FDA, não é recomendada para esse fim. Esses medicamentos são absorvidos de uma forma limitada no tubo digestivo, portanto devem ser administrados juntamente com refeições ricas em lípidos. A terapia inicial recomendada é o albendazol 10 mg/Kg/dia, administrada em cada 12 horas durante 5 dias, com dose máxima diária 400 mg (Despommier *et. al* 2003). Também é recomendado a administração do mebendazol, na dosagem de 20 a 25 mg/kg/dia, com o máximo de 200 mg por toma, por um período de três a cinco dias. Outros medicamentos como o tiabendazol, com a dosagem de 25 mg/Kg/dia, 3 a 7 dias (Magnaival *et. al* 1987) ou a dietilcarbamazina, com uma dose de 3 a 4 mg/kg/dia no período de 15 dias, atualmente não estão disponíveis em Portugal. Parece que a ivermectina não se mostrou efetiva no tratamento da toxocarose (Magnaival *et. al* 1998).

Quando ocorrem reações alérgicas intensas relacionados a LMV pode ser benéfico começar a corticoterapia para controle dos sintomas (Despommier. D *et. al* 2003). A dietilcarbamazina, na dose de 6mg/kg/dia durante 7 a 10 dias, e a terapia recomendada para a LMO, pois alguns estudos sugere a penetração ocular mais eficaz. Em Portugal, recomenda-se o uso de albendazol ou, como alternativa, o mebendazol, nas doses recomendadas para a LMV (Magnaival JF *et. al* 2003, Glickman LT, *et al* 2001). Pensa-se o uso simultâneo de corticóides pode inibir ação dos anti-helmínticos (Park SP., Lee SU., *et al* 2000). Um elemento crucial no tratamento da LMO é o controlo da reação inflamatória, que pode ser mais prejudicial que a própria larva, assim pode-se administrar prednisolona 1-2 mg/Kg/dia por períodos de até um mês, de acordo com a avaliação medica. É necessário fazer uma diminuição progressiva da dose de corticóides. A terapia anti-helmíntica é polémica e deve ser determinado caso a caso, levando em consideração a evolução, na resposta à corticoterapia, e em colaboração com a equipe de Oftalmologia. Pode ser necessário recorrer procedimentos cirúrgicos. Vários autores discutem se é

apropriado começar o tratamento nas formas assintomáticas ou “couvert”, considerando que frequentemente a doença segue um curso autolimitado, terminando de uma forma espontânea (Magnaival *et al.*, 2001).

1.15.2. No hospedeiro definitivo

Atualmente, a maioria dos anti-helmínticos usados em animais domésticos são compostos orgânicos sintéticos, incluindo 1) substitutos fenólicos (por exemplo nitroscanato); 2) salicilanilidas (por exemplo niclosamida); 3) pirimidinas (por exemplo pirantel, morantel e oxantel); 4) os benzimidazóis que são classificados em quatro categoria, incluindo benzimidazóis tiazólicos (Spinosa *et al.*, 2011). Pesquisas realizadas em ratos indicam que o tiabendazol pode inibir migração larvar de *Toxocara* nos tecidos, apesar de não terem sido notado efeitos larvicidas (Othman, 2012). Contudo, seu uso no combate a toxocarose não é recomendado, devido ao seu alto índice de efeitos colaterais (Magnaival *et al.*, 2005). Também se observou uma diminuição no número das larvas totais com o uso de mebendazol e um forte efeito larvicida da substância ativa albendazol (Othman, 2012). No tratamento de *T. canis*, a adição de benzimidazóis carbamatos em lipossomas resultou em um efeito de reserva e uma eficácia aumentada do medicamento. (Hrckova *et al.*, 2007).

Da mesma forma, Horiuchi e colaboradores, (2005 citados por Othman, 2012), confirmaram uma eficácia superior do albendazol através da sua incorporação em lipossomas ligado a polietileno glicol. Pesquisas recentes comprovam a alta efetividade do albendazol PEG 600 em formas sólidas, no tratamento de infecções de *T. canis* em ratos, incluindo a total prevenção da migração das larvas para o cérebro. Portanto, nota-se um uso significativo de albendazol no tratamento de infecções por *Toxocara spp.*, provavelmente por sua segurança comprovada em animais (Othman, 2012). Em cães e gatos, um único tratamento, com a combinação de oxibendazol 3 % niclosamida 24 % (15 mg/kg de oxibendazol), reduziu drasticamente a quantidade dos ovos de *Toxocara* nas fezes de 94,6 % a 100 %, ao passo que uma combinação, com tratamentos múltiplos, de três dias seguidos, reduziu de 91 % a 98 % (Nijse *et al.*, 2013).

A combinação de oxantel (20 mg/kg), pirantel (5 mg/kg) e praziquantel (5 mg/kg) em animais infetados com *T. canis*, resultou em uma eficácia aproximadamente 99 % da

redução dos ovos, no entanto foram observados algumas falhas em animais jovens (dois meses de idade) e cães com diarreia, o que pode sugerir ineficiência desses medicamentos em estádios iniciais (Grandemange *et al.*, 2007).

1.16. Medidas do controlo ambiental:

Devido à elevada resistência dos ovos de *Toxocara* no meio ambiente, é crucial estabelecer estratégias de controle desses parasitas, visando evitar infecções humanas, já que se trata de uma zoonose, bem como diminuir a infecção em animais de estimação (Epe, 2009). Para controlar essa infecção, é crucial assegurar um ambiente higiénico adequado e sensibilizar a população sobre a relevância de recolher as fezes dos animais em parques e áreas públicas (Deplazes *et al.*, 2011; Overgaauw & Knapen, 2013).

Alguns métodos para reduzir a contaminação incluem eliminar infecções evidentes em cães e gatos, por meio de tratamento com anti-helmínticos, aplicar medidas de desparasitação e profilaxia, especialmente em animais jovens e fêmeas gestantes (Epe, 2009; Deplazes *et al.*, 2011). O protocolo da desparasitação deve ser rigorosamente seguido para prevenir o desenvolvimento de larvas de nematódeos até a fase adulta e, consequentemente, evitar a contaminação do ambiente com ovos, uma vez que ainda não existe vacina para prevenir a infecção por *T. canis* em cães (Santarém *et al.*, 2009).

Outro fator relevante na prevenção e controlo ambiental é a realização de exames de fezes, sendo que no primeiro ano devem fazer-se dois a quatro exames, e mais tarde um ou dois exames anuais, associando tratamentos se necessário (CAPC, 2015); tentar diminuir o número de animais errantes; impedir o acesso dos animais a locais públicos, nomeadamente a parques nos quais as crianças tenham acesso; alimentar os animais com comida cozinhada ou enlatada/embalada; cozinhar e lavar os legumes antes da ingestão; e lavar adequadamente as mãos após contactar com fezes dos animais (Epe, 2009; CAPC, 2015). Adicionalmente é importante fazer uma boa desinfeção em clínicas veterinárias, laboratórios e mesmo na habitação. Foi demonstrada alguma eficácia na inibição da embriogénese dos ovos de *T. canis* nomeadamente pelo etanol e o hipoclorito de sódio (Verocai *et al.*, 2010).

1.17. Situação epidemiológica da Toxocarose em Cabo Verde

Em Cabo Verde apesar das populações de cães errantes a frequentar os espaços públicos, ser elevada, verifica-se uma escassez de informação relativa à dinâmica da contaminação dos espaços públicos por *Toxocara*, a forma de transmissão, e o seu tratamento tanto para Animais como para os humanos.

Segundo Mota e colaboradores (2016), reportou-se um caso clínico de toxocarose em uma criança de 5 anos de idade, do sexo masculino natural de Cabo Verde que residia na cidade do Porto, em Portugal, há menos de um mês, e que 15 dias antes do internamento foi na altura em que iniciou os sintomas tais como: tosse acessual irritativa do agravamento progressivo, iniciou rinorreia da mucosa, diarreia incaracterística e autolimitada sem complicações e sem necessidade de recorrer ao serviço de saúde. No entanto semana a seguir os sintomas agravaram-se e a criança deu entrada no hospital do porto, na área da pediatria onde foi submetido aos exames laboratoriais que confirmaram o diagnóstico do LMV e LMC.

Capítulo II: Objetivos

2.1. Objetivo do estudo

Este é um estudo piloto e pretende contribuir para o conhecimento da situação a nível de contaminação ambiental na Cidade da Praia pelo parasita *Toxocara* spp e entre outros helmintas. Pretende-se com este estudo, fazer uma avaliação da prevalência da contaminação do solo nos espaços públicos que tem uma grande repercussão na saúde pública tanto para população dos animais, mais também para população humana jovem assim como para população infantil que são os mais vulneráveis. Apesar de existirem vários estudos já realizados sobre a contaminação dos parques infantis e praças publicas pelo *Toxocara* spp, não há registo na literatura sobre a contaminação ambiental em Cabo Verde. Dessa forma, para contribuir este estudo foram traçados os seguintes objetivos gerais e específicos:

2.2. Objetivo Geral

Avaliar a prevalência dos ovos de *Toxocara* spp. no solo dos parques urbanos e jardins públicos da Cidade da Praia- Cabo Verde.

2.3. Objetivos específicos

- a) Comparar, para cada parque, a prevalência de ovos de *Toxocara* spp. das amostras fecais com as amostras de terras;
- b) Identificar a espécie de ovos de *Toxocara* presente em cada amostra, com recurso a técnicas moleculares.

Capítulo III: Materiais e Métodos

Capítulo III: Materiais e Métodos

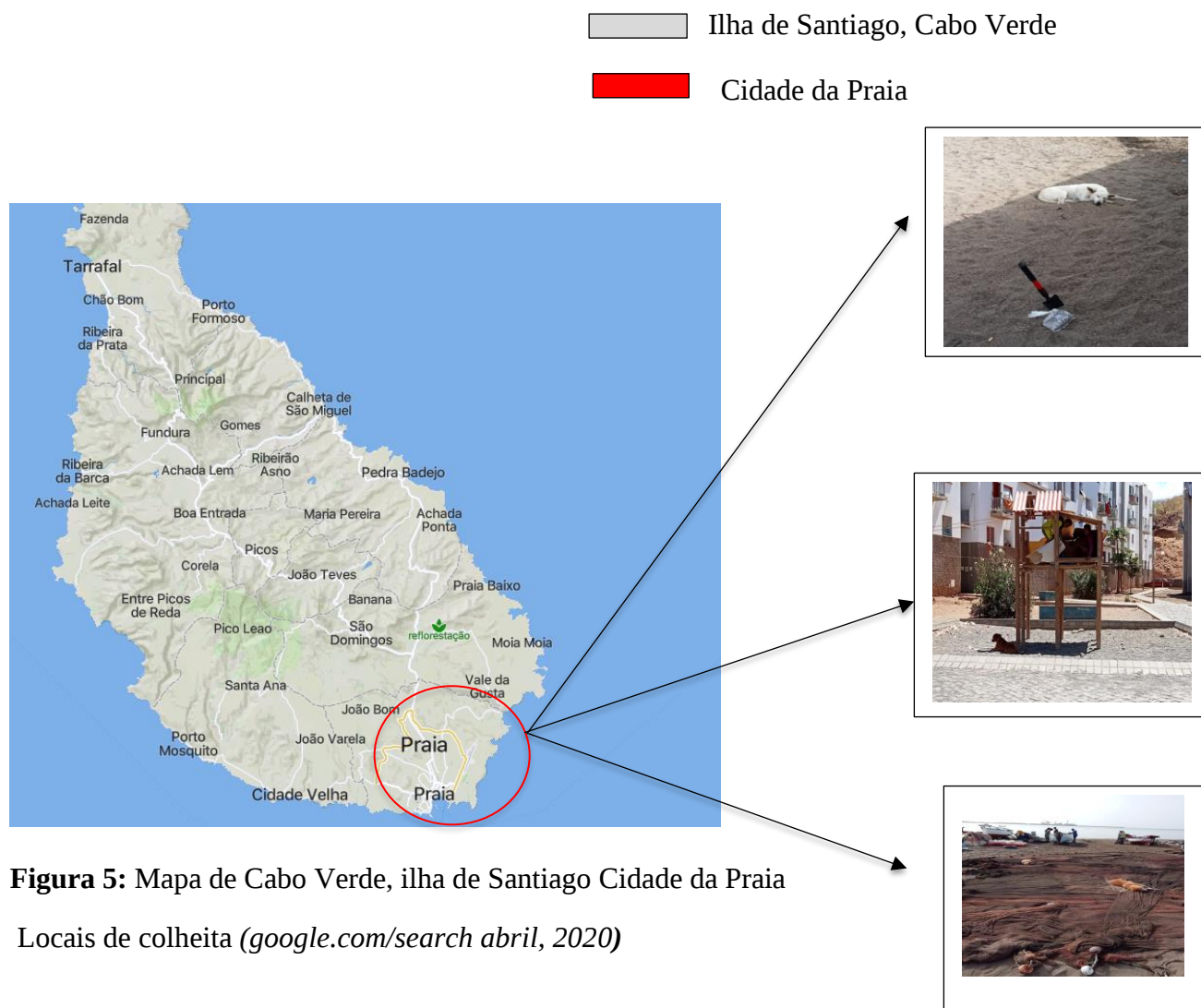
3.1. Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal com avaliação laboratorial que teve como objetivo determinar a taxa de contaminação dos espaços públicos (jardins, parques infantis a praias) por *Toxocara* spp e outras espécies que possam coexistir com importância em saúde humana e animal na Cidade da Praia. A escolha das oito zonas selecionado para o estudo foi feita de uma forma aleatória e também através da sugestão da veterinária responsável pelo hospital veterinário associação “bons amigos” que se afirmou que tem feito desparasitação dos cães nessas zonas e que existe uma elevada população dos cães domésticos e errantes não desparasitados.

3.1.1. Enquadramento geográfico da área do estudo em Cabo Verde

A área do estudo escolhido fica localizado na Ilha de Santiago, que é a maior de Cabo Verde com uma superfície de 991Km², representando cerca de 24,6% do território nacional e com cerca de 55,7% (274.044 habitantes.) da população de Cabo Verde (491 875 habitantes.) sendo que 48% destes, residentes são do concelho da Praia (INE, 2010).

No sul da ilha de Santiago localiza-se o município da Praia entre o concelho de São Domingos, a norte e Ribeira Grande de Santiago, a Oeste, estando os restantes lados banhados pelo mar. Constitui um dos 9 municípios da ilha, privilegiado por albergar a capital do país, a cidade da Praia, que por sua vez se encontra enquadrada na vertente Sudeste daquele município tendo um lado da sua fronteira partilhada com o mar (CMP, 2014; **Figura 5**).



3.2. Local e período de estudo

A recolha dos dados e colheita da amostra foi realizada em 8 zonas na Cidade da Praia, localizada a sul da ilha de Santiago, de março a maio de 2023. Durante a colheita das amostras, foram recolhidas as seguintes informações: presença de crianças em contato com o solo e animais; presença de cães errantes e fezes nas praias, jardins e parques infantis.

3.3. Colheitas das amostras de fezes e de terras

Os locais a integrar neste estudo foram selecionados de forma aleatória e todas as amostras colhidas foram analisadas no laboratório do Instituto Nacional de Saúde Pública

de Cabo Verde (INPS. As amostras de terras e de fezes de canídeos foram colhidas nos locais previamente identificados e descritos em 3.1

Para a recolha das amostras de terras foi adaptada a técnica descrita por Hernández *et al.* (2003) e Santarém *et al.*, (2004). Assim, com uma profundidade até 50 cm, foram colhidas aproximadamente 200g de areia com o auxílio de uma pá de jardineiro e acondicionadas em sacos de plástico devidamente identificados com o número correspondente a cada espaço. Para cada local foram identificados cinco locais de colheita de terras, de acordo com o descrito na **Figura 6**. Todas as amostras foram conservadas em sacos separados e devidamente identificados à temperatura ambiente até ao seu processamento.

Para as fezes, foram ainda colhidas, com auxílio de uma espátula de madeira para frascos de colheita de produtos biológicos esterilizados e devidamente identificados (número correspondente de cada espaço de colheita no concelho da Praia e o número da amostra em causa) 3 amostras de fezes por cada espaço evitando as que estivessem desidratadas.

Após todo esse processo as amostras foram transportadas para o laboratório e mantidas sob refrigeração (4°C) até ao momento do seu processamento, que foi no próprio dia ou no dia imediatamente a seguir a colheita.

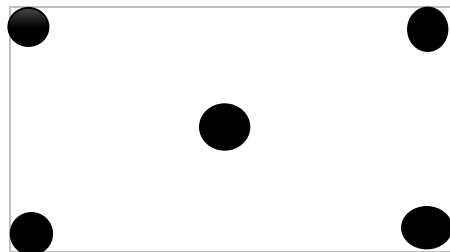


Figura 6: Esquema dos locais de colheita em cada espaço (Santarém *et al.*, 2004 e Hernández., 2003)

3.4. Diagnóstico Laboratorial das amostras das terras e fezes (INPS)

Para pesquisa de ovos de *Toxocara* nas amostras de terras e fezes foram aplicadas as seguintes técnicas: método de Willis, técnica de Sedimentação, técnica de Baerman e Brug (Rugai *et al.*, 1954 & Ferreira *et al.*, 1976),

3.4.1. Diagnóstico parasitológico das amostras de fezes usando a técnica de Willis

A técnica de Willis foi executada para cada amostra de fezes, de acordo com o protocolo utilizado no Instituto de Higiene e Medicina Tropical em anexo (**Anexo, na Figura 7**)



Figura 7: Técnica do Willis para observação dos ovos do *Toxocara* spp nas amostras de fezes (Foto do Autor)

3.4.2. Diagnóstico das formas larvares nas amostras das terras usando técnica de Baerman e Brug

A adaptação da técnica de Baerman e Brug foi efetuada do seguinte modo:

Tamisou-se cada amostra de terra de modo a remover as partículas maiores. De seguida pesaram-se cerca de 100g a 120g de amostra de terras as quais foram colocadas numa gaze dobrada em 8 partes e atadas com um cordão. Seguidamente a água foi aquecida até cerca de 45°C e colocou-se num copo de sedimentação, seguidamente colocou-se a amostra suspensa numa vareta de vidro e em contacto com a água que se encontrava no copo. Deixou-se repousar 1 hora; de seguida observaram-se 3 lâminas por cada amostra ao microscópio ótico (objetiva de 10X e 40X); pesquisou-se a existência de larvas e ovos de *Toxocara* spp. ou outros geohelminths e procedeu a sua identificação (**Figura 8**). Este procedimento foi realizado para cada uma das amostras de terras colhidas em cada espaço selecionado no concelho da Praia. O registo dos resultados foi feito qualitativamente,

indicando para cada amostra positiva qual o parasita encontrado (*Toxocara* spp e outros nemátodes). Após a realização de todo esse processo fez-se as separações das amostras e os sedimentos foram guardados no etanol 100% e transportado para o laboratório do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) para dar continuidade com os exames moleculares.



Figura 8: A Técnica do Baerman e Brug para o diagnóstico das formas larvares nas amostras de terras (Foto do Autor)

3.4.3. Diagnóstico molecular realizadas no laboratório do (IHMT)

Com o objetivo de confirmar a presença de vermes e dos ovos de *Toxocara* nas amostras de terras e de fezes e detetar o parasita nas amostras negativas, foi aplicado o diagnóstico molecular. Para além das amostras de fezes e terras que foram negativas, o diagnóstico molecular também se aplicou as amostras positivas para confirmar a presença do parasita.

3.4.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA genómico para deteção de parasitas nas amostras de fezes e das terras foi realizada de acordo com o protocolo CTAB adaptado (Stothard *et al* 1996). Assim, as amostras de fezes foram centrifugadas, e o etanol que restava foi evaporado. Após verificar que não havia vestígios de etanol, adicionaram-se 600µl do tampão CTAB aquecido a 60°C para o equilíbrio térmico, ao qual se adicionou 10µ de proteína K. O

material foi bastante bem macerado até que os tecidos ficaram completamente dissolvidos no tampão, seguidamente foi a incubar durante 45 minutos a 1 hora a uma temperatura de 65°C. Após o período da incubação foram adicionados 750µl de clorofórmio/isoamylálcool e misturar manualmente durante 2 minutos. Realizou-se uma breve centrifugação e o sobrenadante foi retirado para um novo tubo devidamente identificado, ao qual se adicionaram 900µl de etanol absoluto a 4°C e foi a centrifugar durante 15 minutos a 13 000 rp/m. descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µl de etanol a 70% e foi novamente a centrifugar nas mesmas condições anteriormente descritas. Decantou-se o sobrenadante e retirou-se todo o excesso de etanol. Foi colocado a 60 °C por 10 min para evaporar o etanol. Por último adicionou-se 50 µl de TE e armazenou-se a -20 °C. Para a confirmação do DNA, foi feita a quantificação através do espectrofotómetro NanoDrop™.

3.4.3.2. Amplificação do DNA genómico

Para confirmar a presença de DNA de *Toxocara* spp, as amostras foram submetidas á amplificação para a subunidade I do Citocromo C Oxidase (COI) do DNA mitocondrial (mtDNA), tendo sido utilizados os seguintes oligonucleótidos descritos por Bowles et al., (1992): JB3 (5'-TTTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') e JB4.5 (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'). As reações de PCR foram efetuadas para um volume total de 10 µl, contendo 5 µl da Mix (2x, NZytech), 0,5 µl de cada oligonucleótido (10 pmol/µl), 2 µl de DNA (50 ng)

As condições térmicas utilizadas foram as seguintes: 1 ciclo de desnaturação a 94° C durante 5 minutos, 35 ciclos a 94° C por 30s, 50° C por 30s e 72° C por 30 segundos e uma extensão final a 72° C durante 5 minutos. O tamanho esperado da banda era ± 500pb após a amplificação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com uma migração a 120V durante 30-45m. Seguidamente, o gel foi visualizado no transiluminador ultravioleta (Alpha Innotech) e fotografado.

3.3.4.3. Sequenciação do DNA genômico e análise molecular

Alguns produtos que resultaram da PCR foram sequenciados utilizando os mesmos oligonucleótidos. Para tal, utilizaram-se 10 µl do produto de PCR e 3 µl de cada oligonucleótidos e enviados para o serviço de sequenciação da empresa *StabVida*.

As sequências nucleótídicas parciais que foram obtidas para a região COI foram analisadas através do programa Basic Local Alignment Search Tools (BLAST - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) possibilitando a pesquisa de sequências semelhantes disponíveis nas bases de dados públicas, como a *GenBank* (National Center for Biotechnology Information – NCBI). Os alinhamentos das sequências foram feitos no programa BioEdit versão 7.2 (Hall A. Thomas, 1999) com Clustal W.

As árvores filogenéticas foram obtidas por Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) no programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). com o modelo de mutação mais apropriado.

Capítulo IV: Resultados

Capítulo IV. Resultados

4.1. Locais de colheita e quantidade das amostras

Durante o período de estudo, foram recolhidas um total de 160 amostras nas 8 zonas da cidade da Praia, previamente selecionadas, das quais 20 (12,5%) foram amostras de fezes e 140 (87,5%) foram amostras de terras. Relativamente ao tipo de amostra e a sua localização por local de colheita, observou-se que o maior número de amostras colhidas foi em Fonton com um total de 28 amostras (17.9%), seguido por São Pedro com 25 amostras (16,0%) (**Tabela 1**). Em Gamboa e Quebra Canela apenas foram colhidas amostras de terras, num total de 20 (12,3%) amostras.

Tabela 1: Distribuição da zona de colheita e tipo de amostra

Tipo de amostra			
Zonas de colheita	Fezes	Terras	Total
Cidadela	1 (4.5%)	20 (14.2%)	21 (12.9%)
Fonton	8 (40.0%)	20 (14.2%)	28 (17.9%)
Gamboa	0	20 (14.2%)	20 (12.3%)
Quebra Canela	0	20 (14.2%)	20 (12.3%)
São Pedro	5 (25.2%)	20 (14.2%)	25 (16.0%)
Sucupira	0	10 (7.1%)	10 (6.1%)
Taity	3 (13.6%)	10(7.1%)	13(8.02%)
Vila Vitoria	3 (13.6%)	20 (14.2%)	23 (14.19%)
Total	20 (12,5%)	140 (87,5%)	160 (100%)

Para cada zona de amostragem, foram também identificados os seguintes locais de colheita: a praia, parque infantil, horta urbana e área peri-doméstica. De acordo com os resultados descritos na Tabela 2 e no Gráfico 1, pode-se observar que em Fonton foram identificados dois locais de amostragem: o parque e a horta urbana, tendo-se colhido 15 e 13 amostras, respetivamente. O parque foi o local de amostragem onde se colheu o maior número de amostras ($n=51$), seguindo pela praia com 40 amostras. Na horta urbana e a área peri doméstica, colheram-se 36 e 33 amostras respetivamente.

Tabela 2: Locais de amostragem e respetivo número de amostras

Zona colheita	Praia	Parque	Horta Urbana	Peri-doméstica	Total
Cidadela	0	0	0	21	21
Fonton	0	15	13	0	28
Gamboa	20	0	0	0	20
Quebra Canela	20	0	0	0	20
São Pedro	0	25	0	0	25
Sucupira	0	0	10	0	10
Taity	0	0	13	0	13
Vila Vitoria	0	11	0	12	23
Total	40	51	36	33	160

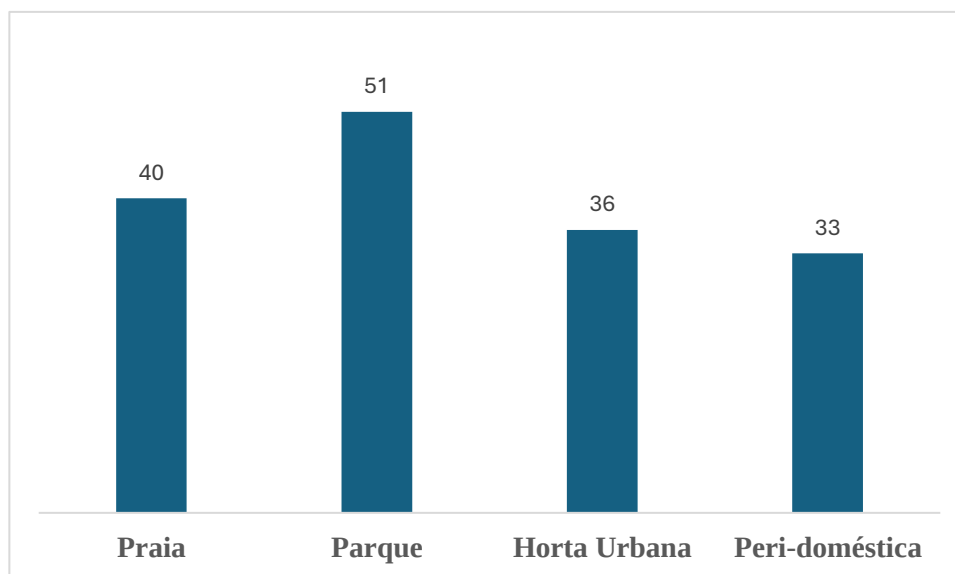


Gráfico 1: Número de amostras colhidas por local de amostragem

4.2. Exposição solar dos locais de colheita

Relativamente a exposição solar dos locais de colheita, foi possível observar que excetuando as hortas urbanas, que estavam pouco iluminados, nos restantes a exposição solar foi total, o que se refletiu na colheita de amostras (**Figura 10 e Figura 11**). Nos pontos de colheita com exposição solar total, foram colhidas 135 amostras e nos que estavam mal iluminados colheram-se 25 amostras (**Tabela 3**).

Tabela 3: Exposição solar dos locais de colheita

	Praia		Parque		Horta Urbana		Peri-doméstica		Total
	Fezes	Terras	Fezes	Terras	Fezes	Terras	Fezes	Terras	
Características do solo									
Ensolarado		40	11	40		11	4	29	135
Sombrio					5	20			25

Tabela 4: Tipo de solo nos locais de colheita

	Praia		Parque		Horta Urbana		Peri-doméstica		Total
	Fezes	Terras	Fezes	Terras	Fezes	Terras	Fezes	Terras	
Características do solo									
Arenoso		40	11	40			4	29	124
Húmido					5	31			36

Por outro lado, quanto ao tipo de solo, verificou-se que nos locais que apresentavam o tipo de solo arenoso colheu-se um total de 124 amostras e nos que apresentam tipo de solo húmido colherem-se 36 amostras (**Figuras 9,10 e 12**) (**Tabela 4**)



Figura 9: Locais da colheita de amostras em solo húmida. A- Zona Fonton – horta urbana B – Zona Taity – horta urbana, (Fotos do Autor).



Figura 10: Locais da colheita de amostras em solo arenoso
(A e B) Praia de Gamboa (Fotos do Autor).



Figura 11: Locais da colheita de amostras em solo arenoso
A- Parque infantil de São Pedro; B- Praia de Gamboa, (Fotos do Autor).



Figura 12: Locais da colheita das amostras em solo ensolarado
(A e B) Zona Taity- horta humana (Fotos do Autor).



Figura 13: Locais de colheita de amostras em solo sombrio (A e B) -Zona Fonton- horta urbana e peridomicilar. (Fotos de Autor).

4.2.1. Local de colheita e presença de animais

De acordo com a análise da **Tabela 5**, das oito zonas de colheita da cidade da Praia onde foram colhidas as amostras de terras e fezes para o estudo, na sua maioria foi possível observar a presença de animais no local de colheita, com exceção a duas zonas, Cidadela e Vila Vitoria (**Figuras 13 e 14**). Sendo assim, esta situação representa um elevado risco de contaminação dos espaços públicos na cidade, uma vez que a maioria desses animais são animais errantes, “sem tutor” e consequentemente não desparasitados, e que defecam nos espaços públicos.

Tabela 5: Presença e ausência dos animais de acordo com os locais de colheita

Local de colheita	Presença dos animais
Cidadela	-
Fonton	+
Gamboa	+
Quebra Canela	+
São pedro	+
Sucupira	+
Taity	+
Vila vitoria	-

(+) – Presença de animais nos locais de colheita

(-) – Ausência de animais nos locais de colheita das amostras de terras



Figura 14: Presença de animais no local de colheita Fonton
A- Parque infantil, B- horta domiciliar (Fotos do Autor)



Figura 15: Presença dos animais no local de colheita: A-Praia de Gamboa zona piscatória B- praia Gamboa (Fotos de Autor)

4.2.2. Exame das terras - Técnica de Baerman e Brug

Ao analisar a **Tabela 6** constata -se que do total de 140 amostras das terras colhidas nas oito zonas da cidade da Praia, na sua maioria os resultados foram negativos, enquanto uma pequena percentagem apresentava resultado positivo, com presença de larvas representando 6 amostras positivas, A **Figura 16** representa algumas das larvas de *Toxocara* spp encontradas nas amostras das terras.

Tabela 6: Resultado das amostras das terras por zonas de colheita

Terras		
Zonas	Positivas	Negativas
Cidadela	0	20
Fonton	4	16
Gamboa	0	20
Quebra Canela	0	20
São Pedro	1	19
Sucupira	1	9
Taity	0	10
Vila Vitoria	0	20
Total	6	134

**Figura 16:** (A e B) presença das larvas de *Toxocara* spp nas amostras das terras colhidas na zona de Fonton e São Pedro (Fotos do Autor).

4.2.3. Exame parasitológico das fezes - Técnica de Willis

Das 20 amostras de fezes colhidas, apenas 5 foram positivas, com ovos de *Toxocara* spp, representando 25% do total das amostras de fezes (**Figuras 17,18 e 19**). Das oito zonas estudadas, Fonton demonstrou ser o local com a maior percentagem das amostras

positivas indicando um foco de contaminação superior em comparação com as outras zonas (Tabela 7).

Tabela 7: Resultado das amostras de fezes por zonas de colheita

Zonas	Fezes	
	Positivas	Negativas
Cidadela	0	1
Fonton	4	4
Gamboa	0	0
Quebra Canela	0	0
São Pedro	1	4
Sucupira	0	0
Taity	0	3
Vila Vitoria	0	3
Total	5	15

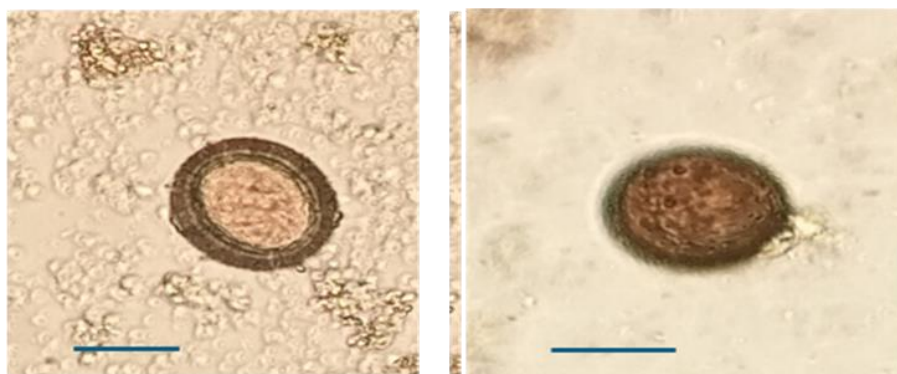


Figura 17: A- Ovos embrionados de *T. canis* em amostras de fezes em hortas urbanas de Fonton B- ovos não embrionados de *T. canis* em amostras de fezes da zona de São Pedro (Fotos do Autor).

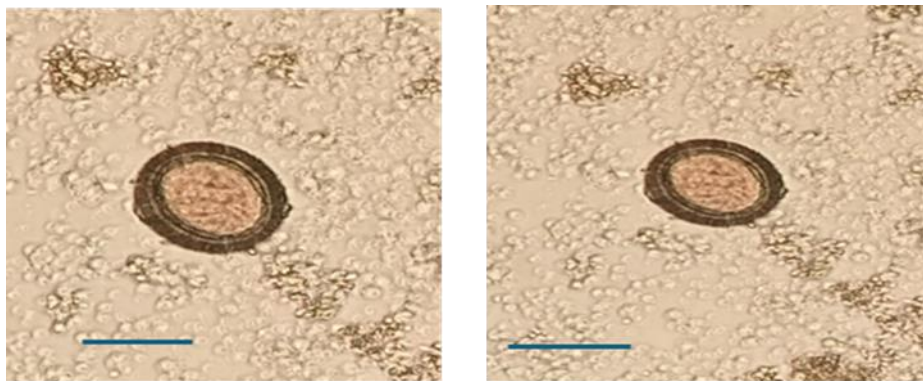


Figura 18: (A) Ovos de *T. canis* em amostras de fezes no parque infantil na zona de São Pedro (Fotos do Autor).

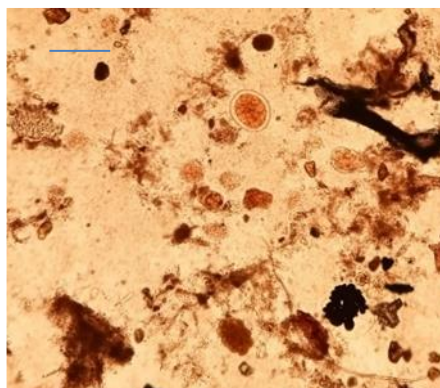


Figura 19: Presença dos ovos de nematodes em amostras de fezes na zona de Fonton (Fotos do Autor).

4.3. Análise molecular

Todas as amostras de fezes e de solo incluídas no nosso estudo, independentemente de serem positivas ou negativas, foram processadas por PCR, de acordo com a metodologia descrita no capítulo anterior. Esta técnica foi utilizada para confirmar a presença do parasita *Toxocara* spp. nas amostras positivas bem como para verificar a presença ou ausência do parasita nas amostras negativas de fezes e solo.

Os resultados obtidos para as amostras que amplificaram, mostraram fragmentos com aproximadamente 500 pb. Assim, de acordo com os resultados da técnica da PCR, para

além das 6 (4,3%) amostras de terras confirmadas pela técnica de *Baerman e Brug* foi possível identificar mais 3 (2,1%) amostras positivas, totalizando nove (9) amostras de terras positivas (**Tabela 8; Figura 20**). Relativamente às amostras de fezes, observou-se um total de 7 amostras positivas correspondendo 35%. Destas, 5 (25%) amostras foram confirmadas através do exame parasitológico e apenas 2 (10%) pela técnica do PCR. Os resultados detalhados encontram-se representado na **Figura 21**.



Figura 20: Resultado da PCR para as amostras de terras para a região COI visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com *brometo de etidium*, que amplificaram fragmentos com aproximadamente 500pb. M- marcador de peso molecular; C+- Controlo positivo.



Figura 21: Resultado da PCR em amostras de fezes para a região COI visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com *brometo de ethidium*, que amplificaram fragmentos com aproximadamente 500pb. M- marcador de peso molecular: C+- Controlo positivo.

Tendo em conta a interpretação dos resultados obtidos na **Tabela 9**, o presente estudo

demostrou que das 20 amostras de fezes analisadas com exame parasitológico e PCR, 7 (35%) amostras foram positivas, 5 (25%) detetadas através do exame parasitológico e 2 (10%) foram detetadas por PCR. (**Figura 21**),

Tabela 8: Resultados positivo representando percentagens das amostras das terras através da técnica de Baerman e PCR

Zonas	Exame das terras (técnica de Baerman)	PCR	Total
Cidadela	0	0	0
Fonton	4	2	6
Gamboa	0	0	0
Quebra Canela	0	0	0
São Pedro	1	1	2
Sucupira	1	0	1
Taity	0	0	0
Vila Vitoria	0	0	0
Total	6 (4,3%)	3 (2,1%)	9 (6,4%)

Tabela 9: Resultados positivo representando percentagens das amostras das fezes através da técnica do PCR e exame parasitológico

Zonas	Exame parasitológico (Técnica de Willi)	PCR	Total
Cidadela	0	0	0
Fonton	4	1	5
Gamboa	0	0	0
Quebra Canela	0	0	0
São Pedro	1	1	2
Sucupira	0	0	0
Taity	0	0	0
Vila Vitoria	0	0	0
Total	5 (25%)	2 (10%)	7 (35%)

4.3.2. Sequenciação e análise filogenética

Para sequenciação, apenas se usaram as amostras amplificadas que apresentaram a melhor resolução e que fossem representativas para as amostras de fezes e de terras. No total foram sequenciadas três amostras, duas de fezes e uma de terra, F12 - fezes de Fonton; F18 - fezes de São Pedro; e T3 relativa a amostra de terra de Sucupira.

As sequências que mostraram resultados incongruentes foram retiradas do estudo, e as que foram incluídas, ainda que parciais, foram alinhadas no *BioEdit*, com *Clustal W* (versão. 7.05.03). A análise filogenética das sequências parciais (amostras de Cabo Verde) para o gene COI foi realizada em conjunto com as sequencias disponíveis no *GenBank*, com o recurso ao programa MEGAX (Kumar *et, al* 2018), com distâncias calculadas através do modelo Kimura-2-parameter. A árvore filogenética obtida, cuja amostras de Cabo Verde estão representadas pela amostra V63 (**Figura 22**) por apresentarem uma homologia de 98%.

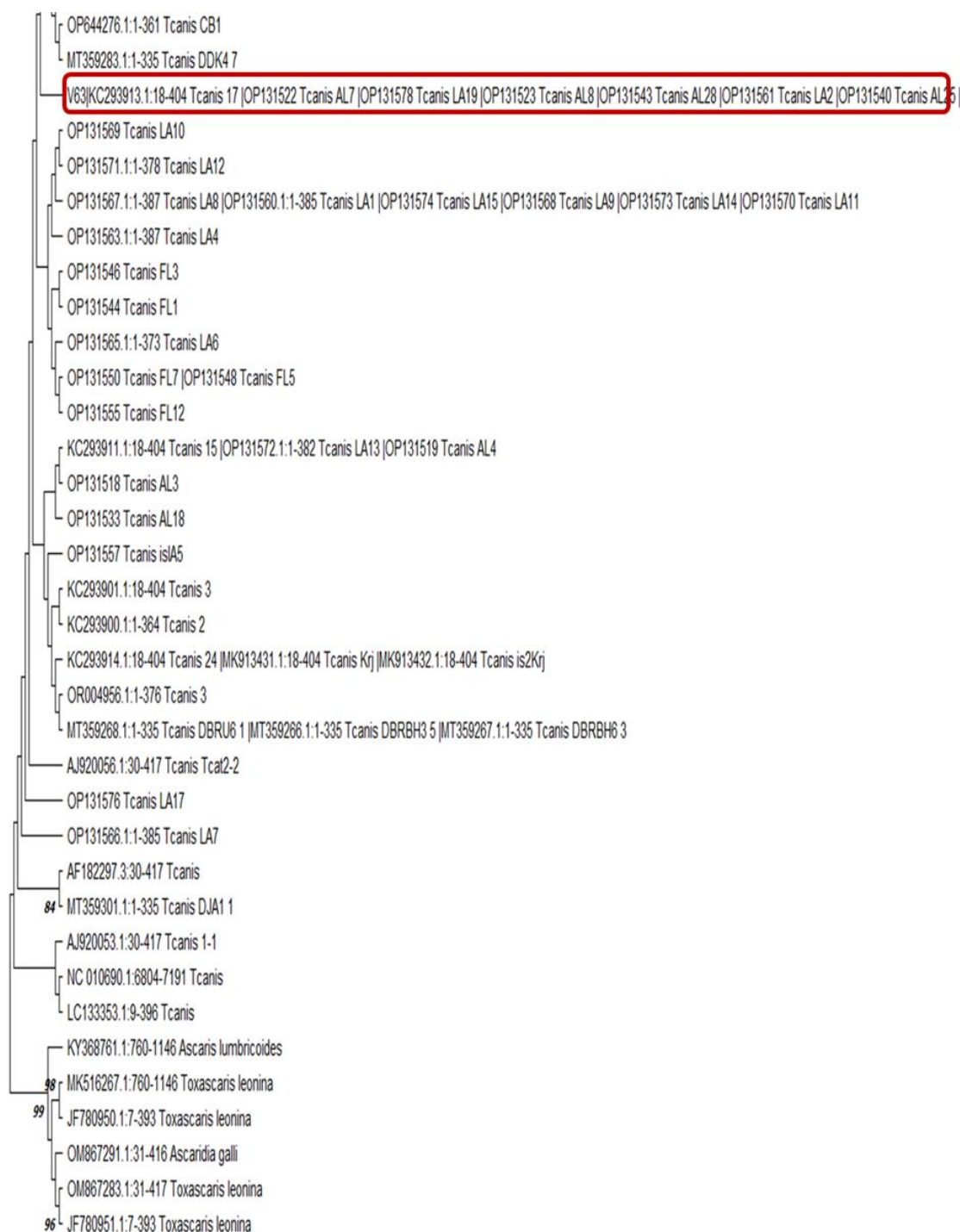


Figura 22: Árvore filogenética com as sequencias de várias amostras de *T. canis* (amostras de Cabo verde) e as seqüências homólogas disponíveis no *GenBank* para o gene COI, apresentando uma similaridade > 98%

Capítulo V: Discussão e Conclusões

5.1. Discussão

Segundo as informações obtidas pelo JORNAL EXPRESSO DAS ILHAS (2020), na freguesia da Praia junto à Câmara Municipal, os levantamentos recentes apontaram uma estimativa de 20 mil cães distribuído por toda cidade. Porém sabe-se que muitos ainda não são registados.

Diversos estudos sugerem que acesso dos animais errantes e de estimação (cães e gatos) não desparasitados ao espaços públicos e área de lazer constituem um risco de contaminação.

De facto, a presença dos animais errantes ou de estimação (cães e gatos) não desparasitados nos ambientes de lazeres e espaço público, continuam a ser um dos maiores problemas associado ao risco de transmissão da toxocarose e a contaminação dos espaços públicos (Tylkowska *et al.*, 2024)

De acordo com os nossos conhecimentos, não existe um consenso quanto a quantidade dos animais, ou seja, números de animais por espaços públicos para que haja a contaminação.

Deste modo, devido a inexistência de informações relativa a contaminação dos espaços públicos por *Toxocara* em Cabo Verde, desenvolveu-se este estudo com o objetivo de avaliar a prevalência dos ovos do *Toxocara* spp no solo dos parques urbanos e nos jardins públicos da cidade da Praia - Cabo Verde, assim como comparar para cada parque, a prevalência dos ovos de *Toxocara* spp. das amostras fecais com as amostras de solo e Identificar a espécie de ovos de *Toxocara* spp presente em cada amostra, com recurso as técnicas moleculares.

Com este estudo piloto, pretendeu-se contribuir para o conhecimento da situação a nível de contaminação ambiental na Cidade da Praia por parasita *Toxocara* spp e entre outros helmintas.

Assim, foram recolhidas um total de 160 amostras, das quais 140 amostras foram terras de vários locais da cidade da Praia e 20 foram amostras de fezes.

As amostras das terras e fezes utilizados para análise neste estudo foram coletadas

estrategicamente, em locais onde as crianças passam maior parte do tempo a realizar atividades de lazer e nas áreas peri domiciliares.

Tal como foi referido anteriormente, as praias, praças e os espaços públicos são considerados locais vulneráveis à contaminação por *Toxocara*, devido a presença dos animais domésticos e errantes não desparasitados.

A determinação da prevalência da contaminação do solo depende do tipo do solo e da técnica utilizada para recuperação dos ovos (Lima *et al.*, 2005).

Neste trabalho foram encontradas larvas do *Toxocara* spp e *Ancylostoma* spp, e nas fezes foram identificados os ovos do *Toxocara* spp com uma baixa prevalência em relação aos outros estudos realizados em alguns países da África, América e na Europa (Neto, 2011).

No entanto, não houve estudos de prevalência publicados recentemente em Cabo Verde sobre este assunto e há pouca informação no que concerne ao risco de contaminação do solo por *Toxocara* spp.

Para este estudo, foram utilizadas técnicas de a) flutuação (método de Willis) para observação das amostras de fezes; b) de sedimentação (Baerman e Brug) para amostras do solo, que demonstrou ser bastante sensível, e por último c) de biologia molecular (PCR).

O presente estudo mostrou que as amostras de terras e fezes colhidas em alguns dos espaços públicos na cidade da Praia nomeadamente na zona de São Pedro, Fonton e Sucupira estavam contaminadas por larvas e ovos de *Toxocara* spp., sendo que para fezes se encontraram 5 amostras positivas no exame parasitológico, usando técnica de Willis e mais 2 amostras positivas, usando a técnica do PCR, somando num total de 7 amostras positivas (35%). Para as terras, 6 amostras foram positivas com a técnica de Baerman e mais 3 com o PCR, totalizando 9 amostras positivas, indicando 6,4% de contaminação. Por fim, esses resultados foram confirmados com a realização do PCR (Figuras 19 e 20).

Estes resultados corroboram o estudo feito por Ferreira *et al.*, (1976) que encontraram dez praças contaminadas com os ovos de *Toxocara* spp. em diferentes regiões da cidade do Rio de Janeiro no Brasil.

Os mesmos resultados vão ao encontro dos observados por Pureza *et al.*, 2015, que

constatou que 5,3% das amostras das fezes colhidas em parques públicos da área grande de Lisboa, estavam contaminadas por *Toxocara*. Resultados esses que apresentam uma desproporção entre o número das amostras das terras e fezes positivas principalmente quando comparado a prevalência reportadas em Portugal pelos alguns autores.

Ainda o mesmo estudo diverge com os resultados dos estudos epidemiológico para determinar a prevalência do *Toxocara* spp realizado por Fonrouge e colaboradores (2000) na Argentina que constatou que das 342 amostras das terras coletadas em 15 a 45 praças 13,2% apresentaram como resultados positivos.

A elevada discrepância dos resultados pode estar relacionada com o reduzido número das amostras estudadas e devido a ter sido realizado em países e região diferentes.

O resultado do presente estudo demonstra uma baixa taxa de prevalência de contaminação por *Toxocara* spp em parques e espaços públicos na cidade da Praia, em comparação com outros estudos, podendo também estar relacionado com o facto da maior parte das amostras ter sido colhidas em ambientes ensolarados, uma vez que os fatores climáticos tais como chuva, humidade, pressão atmosférica e sol interferem na morfologia dos ovos dos parasitas transformando em formas de resistência. Com isso deu para entender que no nosso estudo pelo fato das amostras foram colhidas no verão a temperatura foi um dos fatores que interferiu nos resultados, uma vez que maior numero das amostras positivas foram encontradas em ambiente sombrio, com isso leva nos a pensar que esses parasitas quando estão presente em ambientes húmidas e sombrio os seus ovos eclodem e mantêm a sua morfologia e quando os encontram muito tempo em ambientes ensolarados desidratam e alteram a sua morfologia induzindo muitas vezes o erro na observação dos resultados.

Quanto ao resultado das amostras positivas, tanto para amostras das terras como de fezes não foi detetada correlação significativa entre parasitas do sexo feminino e masculino uma vez que nas algumas amostras de fezes pareceram presença dos ovos e não dos vermes adultos.

A maioria das amostras colhidas no presente estudo foi realizada no verão, em período com a maior frequência das crianças e pessoas em ambientes de lazeres e com oscilação da temperatura que varia de 27 a 30°C.

O encontro dos ovos e larvas no parque infantil de São Pedro e na zona de Fonton, áreas onde a maioria das pessoas e crianças passam o tempo de lazer, com isso demonstra que estes locais são considerados foco de contaminação humana.

A contaminação ambiental em Cabo Verde já era esperada, pelo fato de ser um país do clima tropical uma vez que as condições climáticas e ambientais em país como Cabo Verde favorece a manutenção da sobrevivência dos ovos de *Toxocara* spp.

A temperatura adequada para o desenvolvimento dos ovos de *Toxocara* spp, no solo varia entre 23°C a 35°C (Queiroz *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2011; Fakhri *et al.*, 2018). Com isso demonstra que no nosso estudo a temperatura desempenhou um papel crucial na positividade das amostras uma vez que Cabo Verde é um país que a temperatura média anual varia entre 20° C e 29 °C e oferece todas as condições para os ovos manterem resistente no ambiente na sua forma latente causando infecções tanto para cães como para os humanos.

Por outro lado, o diagnóstico molecular mostrou ser muito mais sensível do que o diagnóstico parasitológico, tendo sido possível identificar através da PCR, mais 2 amostras de fezes e 3 amostras de terras. Estes resultados, estão de acordo com alguns estudos realizados por diferentes autores (Winterfeld *et al.*, 2024; Choobineh *et al.*, 2019), demonstrando que as técnicas moleculares poderão ser um complemento das técnicas parasitológicas.

A contaminação do solo por ovos de *Toxocara* spp nos espaços públicos podem ser influenciadas pelo acesso de cães e gatos (Nijse, *et al.*, 2015).

No presente estudo, os locais onde foram feitas as colheitas não apresentavam vedação para restringir o acesso aos animais. No decorrer do estudo foram observadas fezes, pegadas e presença dos animais, que demonstra o livre acesso dos animais a estes espaços, não só para fazer as necessidades, mas também para procurar sombra e refúgio, representando risco de contaminação ambiental.

5.2. Conclusão

O presente estudo permitiu concluir que:

- a) A prevalência da contaminação com os ovos e larvas do *Toxocara* spp em parques e espaços públicos na cidade da Praia no momento do estudo é preocupante, uma vez que das 160 amostras colhidas, 16 foram positivas representando 10% dos locais estudados;
- b) Os cães errantes que frequentam os espaços públicos na cidade da Praia encontram-se parasitados e contaminam os espaços públicos através das suas fezes.

Estes resultados apresentam um potencial risco para a saúde pública pelo facto de as amostras positivas terem sido encontradas no mesmo espaço onde as pessoas e crianças aproveitam para passar o tempo de lazer.

Sendo assim, as informações presentes no estudo são muito importantes uma vez que podem ajudar a definir estratégias e controlo futuro dentro da população não, somente para parasita *Toxocara*, mas também para outras famílias de nemátodes e outros helmintas que causam as zoonoses.

Embora a prevalência da contaminação dos espaços públicos na Cidade da Praia durante a realização desse estudo ser baixa, é de extrema importância trabalhar no controlo e prevenção por toxocarose não só nos espaços públicos, mas também na população em geral.

Assim, devem ser adotadas medidas, principalmente, no que toca a educação e palestras sobre a causas, sintomas e forma de transmissão e contaminação dos espaços públicos.

Referências Bibliográficas

6. Referencias bibliográficas

- Araújo, F. R.; Crocci, A. J.; Rodrigues, R. G. C.; Avalhaes, J. S.; Miyoshi, M. I.; Salgado, F. P.; Silva, M. A.; Pereira, M. L. (1999). Contaminação de praças públicas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, por ovos de *Toxocara* e *Ancylostoma* em fezes de cães. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n.5 p. 581-583, set-out,
- Balmer, A., & Munier, F. (2007). Differential diagnosis of leukocoria and strabismus, first presenting signs of retinoblastoma. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 1(4), 431–439.
- Beaver P. C. (1956). Larva migrans. *Experimental parasitology*, 5(6), 587–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(56\)90032-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(56)90032-7)
- Beaver P. C. (1969). The nature of visceral larva migrans. *The Journal of parasitology*, 55(1), 3–12.
- Beaver, P. C., Snyder, C. H., Carrera, G. M., Dent, J. H., & Lafferty, J. W. (1952). Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans; report of three cases. *Pediatrics*, 9(1), 7–19.
- Blazius, R.D., Emerick, S. & Prophiro, J.S., (2005). Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães errantes da Cidade de Itapema, Santa Catarina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Uberaba, 38 (1): 73-74.
- Bowles J, Blair D, McManus DP. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol.*;54(2):165– 173. doi: 10.1016/0166-6851(92)90109-W.
- Bowman, D. D., Reinemeyer, C. R., Wiseman, S., & Snyder, D. E. (2014). Efficacy of milbemycin oxime in combination with spinosad in the treatment of larval and immature adult stages of *Ancylostoma caninum* and *Toxocara canis* in experimentally infected dogs. *Veterinary parasitology*, 205(1-2), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar..07.023>
- Castelo, T., Dinis, A. & Rocha, G. (2008). Toxocarose. Protocolo de recomendações Secção de Infeciologista Pediatria spp. (Unidade de Infeciologia da Hospital de Dona Estefânia) – Serviço de oftalmologia do Hospital Pediátrico de Coimbra. *Acta Pediátrica Portuguesa* 39 (4), 171-5.
- Choobineh, M., Mikaeili, F., Sadjjadi, S. M., Ebrahimi, S., & Iranmanesh, S.

- (2019). Molecular characterization of *Toxocara* spp. eggs isolated from public parks and playgrounds in Shiraz, Iran. *Journal of helminthology*, 93(3), 306–312. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18000354>
- Companion Animal Parasite Council (CAPC) [Internet]. (2017). [acedido em 2024 20 outubro]. <https://capcvet.org/articles/the-bond-casts-dogs-and-their-owners-shouldnt-share/>
 - Dillon, A. R., Tillson, D. M., Hathcock, J., Brawner, B., Wooldridge, A., Cattley, R., Welles, B., Barney, S., Lee-Fowler, T., Botzman, L., Sermersheim, M., & Garbarino, R. (2013). Lung histopathology, radiography, high-resolution computed tomography, and bronchio-alveolar lavage cytology are altered by ***Toxocara cati*** infection in cats and is independent of development of adult intestinal parasites. *Veterinary parasitology*, 193(4), 413–426. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.04>.
 - Deplazes P., Knapen F.V., Schweiger A., Overgaaauw P.A.M. (2011) Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis, *Veterinary Parasitology* 182: 41-53.
 - Despommier D. (2003). Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 265–272. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003>
 - Epe C. (2009). Intestinal nematodes: biology and control. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 39(6), 1091–vii. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.07.002>.
 - European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP). (2017). ESCCAP Guideline 01 – Worm Control in Dogs and Cats [Internet]. 3ª Edição. Worcestershire (GB): ESCCAP. [acedido em 2024 Outubro. 9]. https://www.esccap.org/uploads/docs/0x0o7jda_ESCCAP_Guideline_01_Third_Edition_July_2017.pdf
 - Fakhri, Y., Gasser, R. B., Rostami, A., Fan, C. K., Ghasemi, S. M., Javanian, M., Bayani, M., Armoon, B., & Moradi, B. (2018). *Toxocara* eggs in public places worldwide - A systematic review and meta-analysis. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 242(Pt B), 1467–1475. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.087>

- Ferreira LF, Oliveira EL, Camillo-Coura L., (1976). Sobre a presença de ovos de *Toxocara* em praças da cidade do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 10: 51-54,. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821976000200001>.
- Foreyt, W. J. J. (2001). *Veterinary Parasitology – Reference Manual* (5th ed.). Iowa, USA:Wiley-Blackwell.
- Fonrouge, R., M. V. Guardis, N. E. Radman, and S. M. Archelli, (2000): Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* sp. en plazas y parques públicos de la ciudad de La Plata. *Buenos Aires, Argentina. Bol. Chil. Parasitol.* 55, 83–85.
- Graça. I. M (2015). *Infeção por Toxocara em animais de companhia: abordagem ao tratamento e controlo*. Mestrado integrado em Medicina Veterinária,. *Escola Universitária*.
- Foreyt S. H. (1987). Human toxocariasis. *The Journal of applied bacteriology*, 63(6), 473–479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb02716.x>Glickman.
- Glickman, L. T., & Schantz, P. M. (1981). Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiologic reviews*, 3, 230–250. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036235>.
- Gomes, A. D., & Pina, A. F. (2013). Problemas de Recursos Hídricos em ilhas, exemplo da ilha de Santiago, Caso da Bacia Hidrográfica da Ribeira Grande da Cidade Velha, Caso da Bacia Hidrográfica de Ribeira Seca. 6º SILUSBA – Simpósio de Hidráulica e Recursos Hídricos dos Países de Língua Oficial Portuguesa, (p. 697). Maputo.
- González & Cáceres, A. P. S., Gonçalves, F. A., Cazola, I. M. & Carvalho, S. M. S. (2004). Contaminação do solo por helmintos de importância médica na Praia do Sul (Milionários), Ilhéus - Ba. *News lab* - 67: 146-154.
- Good, B., Holland, C. V., Taylor, M. R., Larragy, J., Moriarty, P., & O'Regan, M. (2004). Ocular toxocariasis in schoolchildren. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 39(2), 173–178. <https://doi.org/10.1086/421492>
- Grandemange, E., Claerebout, E., Genchi, C., & Franc, M. (2007). Field evaluation of the efficacy and the safety of a combination of oxantel/pyrantel/praziquantel in the treatment of naturally acquired gastrointestinal nematode and/or cestode infestations in dogs in Europe. *Veterinary parasitology*, 145(1-2), 94–99.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.013>.

- Hrckova, G., Velebný, S., Obwaller, A., Auer, H., & Kogan, G. (2007). Evaluation of follow-up of therapy with fenbendazole incorporated into stabilized liposomes and immunomodulator glucan in mice infected with *Toxocara canis* larvae. *Acta tropica*, 104(2-3), 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.006>
- INE. (2010). Evolução do População residente urbana por Ilha e Concelho, segundo os censos de 1990 - 2010. Obtido em 2014, de Instituto Nacional de Estatística: <http://www.ine.cv>
- Lima, J.L, Andrade, D. L, Santos. A, M. A, Alves, C.L Medeiros. Z, (2005). Contaminação por ovos de *Toxocara* spp, em solo no município de Moreno, estado Pernambuco, Brasil., *Braz J vet Res anim Sci*, São Paulo, V. 42, n.5, p.339-346
- Lewis, J (2006). Vigilância epidemiológica da *Toxocara* e Toxocariase. (capitulo13, Pag 195-210). Em CV. Holanda & HV. Smith (Eds), *Toxocara: o parasita Enigmático*. Acedido de <http://books.google.pt> (consulta a 24/10/2024).
- Katagiri, S & Oliveira-Sequeira, T.C.G, (2007). Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, V.74, n.2, p.175-18.
- Machado AB, Achkar MEE. (2003). *Larva migrans visceral*: um relato de caso. *An bras Dermatol*, 78(2):215-219
- Magnaval J. F. (1998). Apparent weak efficacy of ivermectin for treatment of human toxocariasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(10), 2770. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.10.2770>
- Magnaval, J. F., Glickman, L. T., Dorchie, P., & Morassin, B. (2001). Highlights of human toxocariasis. *The Korean journal of parasitology*, 39(1), 1–11. <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>
- Magnaval, J. F., & Charlet, J. P. (1987). Efficacité comparée du thiabendazole et du mébendazole dans le traitement de la toxocarose [Comparative efficacy of thiabendazole and mebendazole in the treatment of toxocariasis]. *Therapie*, 42(6), 541–544.
- Marques, J.P.; Guimarães, C.R.; Vilas Boas, A.; Carnaúba, P.U. & Moraes, J. (2012). Contamination of public parks and squares from Guarulhos (São Paulo State, Brazil) by *Toxocara* spp. and *Ancylostoma* spp. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao*

- Paulo, 54(5): 267-71, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652012000500006>.
- Merigueti, Y. F. F. B., Santarém, V. A., Ramires, L. M., da Silveira Batista, A., da Costa Beserra, L. V., Nuci, A. L., & de Paula Esposte, T. M. (2017). Protective and risk factors associated with the presence of *Toxocara* spp. eggs in dog hair. *Veterinary parasitology*, 244, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.020>
 - Mota, F, A, Machado, V, Peças, S, Viegas, Emílio, A, Vicente. M *Toxocara canis*, o passageiro clandestino de um voo. Nascer e Crescer, Revista Pediátrica do Centro Hospitalar do Porto, (2016), vol. XXV, nº 2, 25 (2): 113-7.
 - Neto. O.C; Eduardo. (2011) *Contribuição para o estudo de Geohelminths em parques infantis de Brasília* – Brasil. Pág. (5-93) Mestrado em Parasitologia Médica, Instituto de Higiene, Medicina Tropical de Lisboa (IHMT).
 - Nijse, R., Ploeger, H. W., Wagenaar, J. A., & Mughini-Gras, L. (2016). Prevalence and risk factors for patent *Toxocara* infections in cats and cat owners' attitude towards deworming. *Parasitology research*, 115(12), 4519–4525. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5242-8>.
 - Obwaller, A., Duchêne, M., Walochnik, J., Wiedermann, G., Auer, H., & Aspöck, H. (2004). Association of autoantibodies against small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) with symptomatic *Toxocara canis* infestation. *Parasite immunology*, 26(8-9), 327–333. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00716.x>.
 - Oguz B, Ozdal N, Serdar Deger M. (2018) Genetic Analysis of *Toxocara* Spp. in Stray Cats and Dogs in Van Province, Eastern Turkey. *J Vet Res*. V.10; 62(3):291-295. doi: 10.2478/jvetres-2018-0042. PMID: 30584607; PMCID: PMC6296006.
 - Overgaauw P. A. (1997). Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Critical reviews in microbiology*, 23(3), 233–251. <https://doi.org/10.3109/10408419709115138>
 - Overgaauw, P.A.M. & van Knapen, F. (2008). Toxocariasis, an important zoonosis. *European Journal of Companion Animal Practice*, v. 18 (3), p. 260-266,
 - Overgaauw, P. A., & van Knapen, F. (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035>.
 - Otero. D., Nidjsse. R., Gomes. L & colaboradores, (2015). Prevalência de ovos de *Toxocara* spp no solo do parque publico da Área da Grande Lisboa 2015 (1/2): 47-

50.

- Othman A. A. (2012). Therapeutic battle against larval toxocariasis: are we still far behind? *Acta tropica*, 124(3), 171–178. doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.003
- Pando, I. (2015). Ordem Ascaridida. Acedido em 20 Outubro 2024 em <http://slideplayer.com.br/slide/3675894/>.
- Park, S. P., Park, I., Park, H. Y., Lee, S. U., Huh, S., & Magnaval, J. F. (2000). Five cases of ocular toxocariasis confirmed by serology. *The Korean journal of parasitology*, 38(4), 267–273. <https://doi.org/10.3347/kjp.2000.38.4.267>
- Pawlowski Z. (2001). Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *Journal of helminthology*, 75(4), 299–305. <https://doi.org/10.1017/s0022149x01000464>
- Pedrassani, D., Viera, A. M., Thiem, E. M. B. (2008). Contaminação por *Toxocara* spp e *Ancylostoma* spp em áreas de lazer do município de Canoinhas, SC. *Archives of Veterinary Science*, 13 (2): 110 – 117
- Peixoto, C. (2018). "Aplicação de antígeno larvar de *Toxocara canis* no imunodiagnóstico da toxocarose humana". *IHMT: PM - Dissertações de Mestrado*, pág. 80
- Pirão. Q. S. T., (2018). *Prevalência de parasitas intestinais em cães na cidade de Amora, concelho Seixal- Distrito de Setúbal.*, Pag. (2- 75) - (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.
- Queiroz, M. L., Simonsen, M., Paschoalotti, M. A., & Chieffi, P. P. (2006). Frequency of soil contamination by *Toxocara canis* eggs in the south region of São Paulo municipality (SP, Brazil) in a 18 month period. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 48(6), 317–319.
- Regis, S.C.S.; Mendonca, L. R.; Silva, N. S.; Dattoli, V. C. C.; Alcântara-Neves, N. M.; Barrouin-Melo, S. M. (2011). Seroprevalence and risk factors for canine toxocariasis by detection of specific IgG as a marker of infection in dogs from Salvador, Brazil. *Acta Tropical*, v. 120, p. 46– 51,
- REY, L., (2008). *Parasitologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 883pp.
- Reis, A.M., (2008). *Toxocara canis* procura de novo tratamento na Medicina tradicional- estudo *in vitro* e *in vivo*, Instituto de Higiene Medicina Tropical (IHMT), Lisboa.

- Robertson, I. D., Irwin, P. J., Lymbery, A. J., & Thompson, R. C. (2000). The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International journal for parasitology*, 30(12-13), 1369–1377. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00134-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00134-x)
- Rocha S, Pinto RMF, Floriano AP, Teixeira LH, Bassili B, Martinez A, Costa SOP, Caseiro MM. (2011). Environmental analyses of the parasitic profile found in the sandy soil from the Santos municipality beaches, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 53(5):277-281. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652011000500007>
- Rubinsky-Elefant, G., Hirata, C. E., Yamamoto, J. H., (2010). Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 104(1), 3–23. <https://doi.org/10.1179/136485910X12607012373957>.
- Rugai E, Mattos T, Brisola (1954). A nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes - modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 14: 5-8.
- Santarém VA, Rubinsky-Elefant G, Chesine PAF, Leli FNC (2009). Toxocaríase canina e humana. *Veterinária e Zootecnia*; 16(3):437-447.
- Schantz P. M. (1989). *Toxocara* larva migrans now. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 41(3 Suppl), 21–34. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.21>.
- Schmidt, G. & Roberts, L., (2008). *Foundations of Parasitology* (8th ed.). New York: McGraw Hill.
- Sousa P. H. F.; Manhoso F. F. R. (2008). Aspectos epidemiológicos da toxocaríase canina e sua repercussão na saúde pública. *Unimar Ciências*, v. 17, p. 1-2,.
- Spinosa H.S., Górnica S.L., Bernardi M.M. (2011) *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*, 5ª ed., Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara Koogan, pp.501-533
- Stiles, Charles Wardell, Hassall, Albert, & United States. (1905). *The determination of generic types: and a list of roundworm genera, with their original and type species*. U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Animal Industry. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.31560>
- Strube C, Heuer L, Janacek E. (2013). *Toxocara* spp. Infections in paratenic hosts

- [Internet]. [acedido em 2018 Ago 3]. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033>.
- Taira, K., Saeed, I., Permin, A., & Kapel, C. M. (2004). Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Veterinary parasitology*, 121(1-2), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.018>
 - Taylor MA, Coop RL, Wall RL. (2016). *Veterinary Parasitology*. 4ª Edição. Chichester (GB): Wiley Blackwell.
 - Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M., E Jennings, F. W. (1996). *Parasitologia Veterinária*. 2ª Ed.: p. 25-117,.
 - Verocai, G. G., Tavares, P. V., Ribeiro, F.de A., Correia, T. R., & Scott, F. B. (2010). Effects of disinfectants on *Toxocara canis* embryogenesis and larval establishment in mice tissues. *Zoonoses and public health*, 57(7-8), e213–e216. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01330.x>
 - Vieira, R. A. (1978). *Toxocara canis*: sua importância em saúde pública. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, I(3):233-248.
 - Virgens, C.J.S. (2015). *Desenvolvimento de ensaio de elisa indireto para detecção específica de Igg anti-toxocara em cães*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia. 83 págs.
 - Tylkowska, A., Mocha, N., Kołnierzak, M. M., & Szenejko, M. (2024). Risk Factors Associated with Soil-Transmitted Helminths in Dog Feces That Contaminate Public Areas of Warsaw, Poland. *Animals*, 14(3), 450. <https://doi.org/10.3390/ani14030450>
 - Wilder, (1950). H.C. *Endoftalmite por nematoides.*, tradução Am. Acad. Otorrinolaringologia, 55 (1950), pp. 99-10.
 - Winterfeld, D.T., Schauer, B., Globokar, M. *et al.* (2024). Comparison of different diagnostic protocols for the detection of *Toxocara* spp. in faecal samples of cats and dogs. *Parasites Vectors* 17, 436 <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06524-x>
 - Zajac, A. M., & Conboy, G. A. (2012). *Veterinary Clinical Parasitology* (8th ed., Vol. 40). Oxford: Blackwell Publishing.

Anexos

7. Anexos

7.1. Materiais

Para a coleta e análises da amostra das terras e das fezes foram usados seguintes materiais:

- ✓ Potes de plásticos, descartáveis, com boca larga (50 mm de diâmetro) transparente de tampa rosca (40 mm), capacidade de 35 a 50 ml
- ✓ Luvas
- ✓ Batas
- ✓ Sacos de plásticos
- ✓ Espátulas de madeiras
- ✓ Pa do jardineiro
- ✓ Caneta e marcadores
- ✓ Mala de transporte das amostras
- ✓ Laminas e lamelas
- ✓ Microscópio ótico
- ✓ Peneira de malhas finas
- ✓ Jarro de sedimentação
- ✓ Gaze
- ✓ corda
- ✓ Varetas de vidro
- ✓ Tubos de Willis
- ✓ Pipetas Pasteur
- ✓ Placas de Petri
- ✓ Pinças
- ✓ Cronometro
- ✓ Etiquetas
- ✓ Camara de fluxo laminar
- ✓ Frigorifico
- ✓ Balança etc...

7.1. Reagentes

- ❖ Solução saturada de cloreto de sódio (NaCl)
- ❖ Lugol
- ❖ Água destilada
- ❖ Etanol
- ❖ Álcool 70%

7.2. Protocolo para extração do ADN dos vermes de *Toxocara* sp (Stothard, 1996)

- a) Colocar o tampão de extração CTAB na estufa a 60° C para o equilíbrio térmico;
- b) Retirar um pedaço do verme e colocá-lo num novo tubo. Seguidamente adicionar 500 µl do tampão CTAB que foi previamente aquecido a 60° C. Adicionar 8 µl de proteinase K e homogeneizar muito bem até que os tecidos fiquem completamente dissolvidos no tampão;
- c) Seguidamente vai a incubar durante 45 min a 1 hora e posteriormente deixa durante a noite a 37°C.
- d) Após o período de incubação adicionar 600 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e misturar manualmente durante dois minutos;
- e) Centrifugar rapidamente para que haja separação da zona aquosa da zona orgânica. De seguida pipetar a camada aquosa para um tubo novo e adicionar 800 µl de Etanol absoluto a 4° C e misturar. Centrifugar durante 15 minutos a 13 000 rpm.
- f) Decantar o sobrenadante e adicionar novamente 500 µl de etanol a 70% para a lavagem da “pellet” e voltar a centrifugar nas mesmas condições anteriormente descritas. Decantar novamente o sobrenadante e retirar cuidadosamente todo o excesso de etanol. Colocar na estufa, no máximo durante 10 minutos, para que haja a evaporação total do etanol.
- g) Adicionar 50 µl de tampão TE e agitar o tubo de modo que a “pellet” se dissolva. As amostras devem ser guardas em alíquotas a -20 ° C.
- h) Proceder à quantificação do DNA em NanoDrop (absorvância).