

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas

MOW
546.8:619
F323 A
TES/MEM

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Álvaro Ferreira Júnior

Diagnóstico coproparasitológico e
detecção de anticorpos anti-*Strongyloides stercoralis*
em amostras de soros de cães domésticos

SISBI/UFU



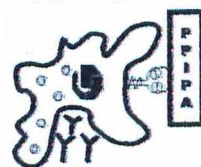
1000220843

Uberlândia, MG

2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
Telefax: (034)3218-2333 E-Mail coipa@ufu.br
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



Álvaro Ferreira Júnior


“Diagnóstico coproparasitológico e detecção de anticorpos anti-Strongyloides stercoralis em amostras de soros de cães domésticos”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 30e maio de 2005.



Prof. Dr. Walter dos Santos Lima - UFMG



Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva – UFU



Prof. Dra. Julia Maria Costa Crus – UFU

Álvaro Ferreira Júnior

**Diagnóstico coproparasitológico e
detecção de anticorpos anti-*Strongyloides stercoralis*
em amostras de soros de cães domésticos**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia
Aplicadas da Universidade Federal
de Uberlândia, como requisito
parcial para a obtenção do Título de
Mestre.

Prof^a. Dr^a. Julia Maria Costa-Cruz
Orientadora

Uberlândia, MG
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Biblioteca

SISBI/UFU
220843



FU00034910-4

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

- F383d Ferreira Júnior, Álvaro, 1970-
Diagnóstico coproparasitológico e detecção de anticorpos anti-
Strongyloides stercoralis em amostras de soros de cães domésticos /
Álvaro Ferreira Júnior. - Uberlândia, 2005.
66f. : il.
Orientador: Julia Maria Costa-Cruz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia. Pro-
grama de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. *Strongyloides stercoralis* - Te-
ses. 3. Estrongiloidíase - Teses. 4. Cão - Parasito - Teses. 5. Diagnóstico
imunológico - Teses. 6. Imunofluorescência - Teses. I. Costa-Cruz, Julia
Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Gradua-
ção em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.8:619(043.3)

Trabalho realizado no laboratório de Parasitologia, área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, sob orientação da Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz e apoio financeiro da Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Manuscrito submetido à publicação no *Veterinary Parasitology*, fator de impacto: 1,583.

Tributo a um cão

“... O mais altruísta dos amigos que um homem pode ter neste mundo egoísta, aquele que nunca o abandona e nunca mostra ingratidão ou deslealdade, é o cão.”

Senhores jurados, o cão permanece com o seu dono na prosperidade e na pobreza, na saúde e na doença.

Ele dormirá no chão frio, onde os ventos inverniais sopram e a neve se lança impetuosamente.

Quando só ele estiver ao lado do seu dono, ele beijará a mão que não tem alimento a oferecer, ele lambe as feridas e as dores que aparecem nos encontros com a violência do mundo.

Ele guarda o sono de seu pobre dono como de fosse um príncipe.

Quando todos os amigos o abandonarem, o cão permanecerá.

Quando a riqueza desaparece e a reputação se despedaça, ele é constante em seu amor como o Sol na sua jornada através do firmamento.

Se a fortuna arrasta o dono para o exílio, o desamparo e o desabrigo, o cão fiel pede o privilégio maior de acompanhá-lo, para protegê-lo contra o perigo, para lutar contra seus inimigos.

E quando a última cena se apresenta, a morte o leva em seus braços e seu corpo é deixado na laje fria, não importa que todos os seus amigos sigam seu caminho: lá ao lado de sua sepultura se encontrará seu nobre cão, a cabeça entre as patas, os olhos tristes, mas em atenta observação, fé e confiança mesmo à morte.”

Este tributo foi apresentado ao júri pelo ex-senador George G. Vest (então advogado), que representou o proprietário de um cão morto a tiros, propositalmente, pelo vizinho.

O fato ocorreu há um século na cidade de Warrensburg, Missouri, nos Estados Unidos da América. O senador ganhou o caso e hoje existe uma estátua do cão na cidade e seu discurso está inscrito na entrada do tribunal de justiça da cidade.

Dedicatória

A Deus

Nunca direi foram os meus braços ou a minha força que me deram essa vitória,
Antes direi Misericordioso e Bom é o Senhor que me concedeu êxito nessa pesquisa,
Nunca me sobreveio uma tentação que não fosse humana.
Sempre fiel foi o Senhor que nunca permitiu que eu fosse provado acima da minha capacidade, pelo contrário junto com a dificuldade sempre supriu o escape para que eu pudesse suportar!
Obrigado Pai Celestial!!!

À Juvenília Mota Leite (“Vó Nila”) *in memoriam*.

Professora de escola primária do interior de Minas Gerais, mulher forte, determinada. Com pouco fazia muito.
Já fazem dois anos da sua partida, sinto saudades!!!
Da senhora vieram muitos outros educadores, sua filha e alguns netos.
Quem sabe quantos mais virão.
Minhas filhas?
Minhas netas?
Vó, aqui uma homenagem à senhora.
Juninho

A minha família Glauciene, Gabriela e Daniela

Não se recuperam os dias da infância das minhas filhas que eu não pude acompanhar, os sorrisos, as brincadeiras, quase tudo passou.
Não se recuperam as noites em frente ao computador em que a família ficou em segundo plano.
Os finais de semana estudando sem passear.
Que preço paga a família, para quem queremos tanto o bem.
São os maiores sofredores.
Ainda assim nos suportam e incentivam.
Muito obrigado, sou um eterno devedor!!!
Junior (Papai)

Aos Pais

Pai e mãe, palavras tão curtas, no entanto no amor excedem o tamanho.
Tudo suportam, tudo esperam, tudo sofrem.
Alegram-se com a nossa felicidade e com as nossas vitórias.
Vocês sempre souberem do meu sonho, pois é, virou realidade.
Mas não pára aqui, há uma estrada para percorrer e mais dedicatórias para escrever.
Amo vocês!!!
Júnior

Agradecimento Especial

À duas mulheres que admiro e respeito pelo caráter, profissionalismo, competência e contribuições para a parasitologia brasileira e mundial. Vocês acreditaram e investiram em mim, espero não ter ficado muito abaixo das expectativas.

Prof^ª Dra. Julia Maria Costa-Cruz

e

Prof^ª Ms. Dagmar Diniz Cabral

Dra. Julia na orientação dessa pesquisa, sempre trouxe a equipe ao caminho dos resultados.

Deus abençoe sua vida, sua família. Entregue seu caminho ao Senhor, confia Nele e o mais Ele fará!!!

Dagmar, obrigado por seus conselhos, sugestões e toda a ajuda.

Sua vida reflete algo especial de Deus: Ele nos dá muito mais do que pedimos ou pensamos. Amém!!!

Um abraço!!!
Álvaro

AGRADECIMENTOS

Ao Bob, um cão, que sem contestação abdicou de sua juventude em prol da ciência, meu sincero agradecimento através do cuidado que tive com sua saúde e bem-estar. Sem saber você ajudou a formar doutores e mestres. Nunca vou esquecer de você companheiro!!!

Aos proprietários dos canis que permitiram as colheitas de materiais biológicos, obrigado pela receptividade e confiança.

À Maria das Graças Marçal (“Gracinha”) o que seria de nós sem você? Meu braço direito nessa pesquisa, dentro do laboratório.

À Maria do Rosário de Fátima Gonçalves-Pires (“Rô”) foi o meu braço esquerdo nessa pesquisa, na parte dos testes imunológicos.

À Deise A. O. Silva, médica veterinária e pesquisadora, obrigado pela ajuda nos testes imunológicos e na correção do *paper*.

À Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, obrigado por sua colaboração na leitura dos exames parasitológicos dos cães.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia, Geraldo, Marianna, Camila, Gleyce, Solange, Rosângela Maria, Rosângela Terezinha, Elaine, Sheila e Juliana.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da UFU, pelos conhecimentos transmitidos, treinamento e experiência.

Aos funcionários Neto, Lucileide e Jorge obrigado pela paciência e camaradagem.

A todos os colegas do PPIPA-UFU, pela convivência, amizade e companhia.

Ao amigo Adair Tomaz Dutra, médico veterinário, pela compreensão e cooperação na área profissional.

Às médicas veterinárias Jandra Pacheco dos Santos, Michele Goulart, Janaína de Oliveira, Mariane Pacheco dos Santos por ajudarem cuidando do Bob, nas coletas, pela compreensão e amizade.

Aos pastores Moacir Santos Carvalho e Eduardo Santos Carvalho, pelas orações e apoio.

Ao amigos Fausto, Arnaldo Nogueira, Francisco Sales, pelas orações, incentivo.

À Comunidade da Fé – Igreja Evangélica pelas intercessões e apoio.

À Vani Arantes Silva, minha sogra, pelo amor e dedicação às minhas filhas, todos os dias.

À Fundação Ezequiel Dias pela doação do conjugado para imunofluorescência.

À Jean Ezequiel Limongi do laboratório de sorologia do Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia pela intermediação com a Fundação Ezequiel Dias.

A Edmar Donizete Mundin e Taís Silva, do Laboratório de Análises Veterinárias do Triângulo (LABORVETRI) pela ajuda na coleta e conservação dos soros dos cães, nos finais de semana.

À todos aqueles, os quais a memória, depois de dois anos de mestrado, me traiu e esqueci. Um grande abraço, todos contribuíram em algum momento dessa conquista!!!

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos morfo-biológicos de <i>S. stercoralis</i>	2
1.2. Epidemiologia da estrogiloidíase canina.....	7
1.3. Aspectos clínicos e imunológicos da estrogiloidíase canina.....	18
1.4. Métodos diagnósticos da estrogiloidíase canina.....	21
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Aspectos éticos.....	24
3.2. Localidades e cães.....	24
3.3. Amostras de fezes e soros.....	25
3.4. Diagnóstico Parasitológico.....	26
3.4.1 Método de Baermann (1917).....	26
3.4.2 Método de Lutz (1919).....	26
3.5. Diagnóstico Imunológico.....	27
3.5.1. Obtenção de <i>Strongyloides stercoralis</i>	27
3.5.2. Produção de antígeno particulado.....	27
3.5.3. Produção de antígeno salino.....	28
3.5.4. Testes para detecção de anticorpos anti- <i>S.stercoralis</i>	28
3.5.4.1. Teste de imunofluorescência Indireta (IFAT).....	28
3.5.4.2. Teste ELISA.....	29
3.6. Análise estatística.....	30

4. RESULTADOS.....	31
4.1. Diagnóstico parasitológico.....	31
4.2. Diagnóstico imunológico.....	35
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	48
7. RESUMO.....	49
8. ABSTRACT.....	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

O interesse por animais de companhia (*pets*) tem aumentado especialmente no centros urbanos do Brasil. Apesar da grande variedade de *pets*, os cães continuam sendo os preferidos pela maioria das pessoas (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002). Eles exercem uma importante função na sociedade, trazendo bem estar físico e psicológico às pessoas; entretanto, há os riscos à saúde humana associados ao convívio próximo com os animais, devido à possibilidade de infecção por helmintos (nematódeos, cestódeos), protozoários, bactérias, vírus e fungos transportados nas fezes. A estrogiloidiase canina é uma doença causada pelo nematódeo intestinal *Strongyloides stercoralis*, que possui potencial zoonótico (ROBERTSON, THOMPSON, 2002).

O parasito *S. stercoralis*, em humanos, foi primeiro observado pelo médico francês Louis Normand em 1876, na cidade de Toulon - França, quando examinava fezes diarréicas de soldados franceses que serviram na Conchinchina, atual Vietnã. Bavay, farmacêutico e colaborador de Normand, classificou as formas encontradas nas fezes como *Anguillula stercoralis* (latim "Änguillula" = pequena enguia ou peixe longo e "stercus" = esterco) e como *A. intestinalis* as presentes na luz intestinal de indivíduos necropsiados (GROVE, 1996).

A susceptibilidade dos cães a infecção por *S. stercoralis* foi primeiro reconhecida por FUELLEBORN (1914). Ele relatou que os parasitos identificados como *S. stercoralis*, nos cães, eram indistinguíveis daqueles diagnosticados no homem, e que a cepa isolada de humanos podia infectar os animais.

GRASSI, PARONA e PARONA em 1879, redescreveram o parasito, denominando o gênero *Strongyloides* e definindo as diferenças entre as larvas rabditóides deste e as de *Ancylostoma*. Em 1882, LEUCKART apoiando as idéias de Grassi, demonstrou que as

espécies *S. stercoralis* e *S. intestinalis* eram um só parasito, que ele descreveu como *Rhabdonema stercoralis*. Em 1902 STILES e HASSALL determinaram definitivamente o nome *S. stercoralis* (grego "Strongylos" = arredondado ou esférico).

Deve-se ressaltar os nomes de parasitologistas brasileiros, que foram pioneiros nos estudos de *S. stercoralis*, entre eles estão RIBEIRO DA LUZ (1880), ADOLFO LUTZ (1885), PRAGUER FROÉS (1930), GOMES DE FARIA (1911), DA MATA (1914), TORRES (1917), MARTINI (1938), RENAULT e VERSIANI (1940), SENRA e FELICISSIMO (1942), CANÇADO (1943) e MORAES (1948).

Existem descritas 52 espécies de *Strongyloides*, entre as que são de interesse veterinário estão: *S. chapini* (*Hydrochoerus hydrochaeris*), *S. fuelleborni* (*Pan troglodytes*, *Homo sapiens* na África e Papua, na Nova Guiné), *S. minimum* (*Anas bahamensis*), *S. oswaldoi* (*Gallus gallus*), *S. ophidiae* (*Drymobius bifossatus*), *S. papillosus* (ruminantes), *S. ransonii* (*Sus scrofa*), *S. ratti* (*Rattus norvegicus*), *S. stercoralis* (vários hospedeiros), *S. tumefaciens* (*Felis catus*), *S. venezuelensis* (*Rattus norvegicus*) e *S. westeri* (*Equus caballus*) (MORAES, 1948; FREITAS, 1976; SOULSBY, 1982; GROVE, 1996).

1.1. Aspectos morfo-biológicos de *S. stercoralis*

S. stercoralis é um helminto monoxeno, dimorfobiótico, com formas adultas parasitárias e de vida livre, morfologicamente distintas (MORAES, 1948).

As fêmeas parasitas habitam o intestino delgado, mergulhadas na mucosa próximo às glândulas de Lieberkühn. Medem 1,7 a 2,5 mm de comprimento e 35 a 45 µm de diâmetro, tendo a porção anterior mais afilada e a posterior curta e romba. Possui cutícula fina, semi-transparente e estriada transversalmente em toda a extensão do corpo. A vulva encontra-se

em posição ventral, no terço médio do corpo, tendo dois lábios distintos e pouco proeminentes. O ânus é transversal, próximo da extremidade posterior. O aparelho digestivo é simples, com boca hexagonal provida de lábios inconspícuos cercados por seis papilas, à qual se seguem uma pequena cavidade bucal e um curto vestíbulo. Possui esôfago alongado, filariforme, cilíndrico, com pequena dilatação anterior, medindo de um terço a um quarto do comprimento do helminto, e anel nervoso à altura do quinto anterior do esôfago, além de dois canais excretores longitudinais, correndo ao longo do parasito, conectados um ao outro e a uma única célula excretora, por um ducto transversal, imediatamente atrás do anel nervoso. O útero em posição anfidelfa, ocupa quase a totalidade dos dois terços posteriores do parasito, possuindo em seu interior seis a nove ovos em graus variáveis de maturação, dispostos em série, com ovidutos em continuação e na mesma orientação dos úteros (GROVE, 1996). A característica cromossomal das fêmeas parasitas (triplóides) está de acordo com sua aptidão para a partenogênese, apresentando a capacidade de reprodução na ausência de machos (MORAES, 1948; HENDRIX; BLAGBURN; LINDSAY, 1987).

A fêmea de vida livre é menor que a fêmea partenogenética, é fusiforme e mede de 800 μm a 1,2 mm de comprimento e 50 μm de diâmetro. Possui cutícula hialina, translúcida, delgada e estriada transversalmente, além de extremidade anterior arredondada e posterior afilada. A boca é pequena, com lábios inconspícuos, seguida por curto vestíbulo, e o esôfago é curto, medindo entre a sétima e a oitava parte do comprimento total do corpo, dividido em três porções, uma anterior, cilíndrica e alongada, uma intermediária estreita e uma posterior globulosa (bulbo) do tipo rabdiforme. O ânus situado junto a uma papila, a pouca distância da extremidade posterior, e a vulva situada próxima

ao meio do corpo, com dois lábios conspícuos, proeminentes. Possui úteros em posição anfidelfa, ocupando grande parte do corpo do helminto, contendo ovos em graus diferentes de maturação, dispostos em série, com oviduto em continuação com os úteros, ligando-se aos ovários dobrados em orientação contrária aos respectivos úteros (GROVE, 1996).

O macho de vida livre mede 490 a 740 μm , corpo cilíndrico, estreitando-se para a extremidade anterior, que é arredondada, e a posterior afila-se abruptamente, recurvando-se ventralmente terminando em ponta romba. A cutícula é semelhante à da fêmea. Os lábios são indistintos, e o esôfago com morfologia análoga à da fêmea e equivalente à sexta ou sétima parte do comprimento do corpo. Os testículos ocupam grande extensão do corpo, contendo espermatogônias, espermátócitos e espermatozóides, abrindo-se em uma cloaca rodeada por dois espículos copulatórios, iguais ou sub-iguais canaliculados, curvos, intimamente relacionados com o gubernáculo (MORAES, 1948; GROVE 1996).

Os ovos são depositados na mucosa intestinal nas glândulas de Liebekühn, sendo sua forma elíptica, com parede fina e transparente, deixando perceber no momento da postura o embrião parcial ou inteiramente desenvolvido, medindo de 50-58 μm de comprimento por 30-34 μm de diâmetro. Excepcionalmente, em indivíduos com o trânsito intestinal acelerado, pode-se observar nas fezes, ovos do helminto já embrionados. Os ovos da fêmea de vida livre são semelhantes aos da fêmea parasita, medindo 70 μm de comprimento por 40 μm de diâmetro (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

As larvas rabditóides (L1 e L2) são formas que podem encontrar-se nas fezes, na bile, no escarro, na urina, nos líquidos duodenal, pleural e cefalorraquiano. Medem de 250 a 350 μm de comprimento e 14 a 16 μm de diâmetro, possuem a porção anterior fina e arredondada com a extremidade posterior afilando-se gradualmente, terminando em ponta

com ápice rombo. Possuem Cutícula delgada e hialina, que apoia-se sobre uma camada granular; a boca é pequena, com vestibulo curto e profundidade sempre menor que o diâmetro da larva. O esôfago é rabdiforme, com dois bulbos, o anterior cilíndrico e alongado, o posterior globuloso e, entre os dois, uma porção estreitada; seu comprimento varia com o desenvolvimento da larva. O intestino possui a porção anterior mais estreita, e o ânus é relativamente afastado da extremidade posterior. O primórdio genital é desenvolvido e está situado no meio do corpo, formando um conjunto de células em número de seis a 18 (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2000).

A larva filarióide (L3) infectante é encontrada nas fezes, em fluidos corporais e no ambiente, ela pode penetrar a pele ou mucosas e migrar pelos tecidos do hospedeiro (GROVE, 1996). Mede 350 a 450 μm de comprimento e o diâmetro é de 30 a 35 μm . A porção anterior é afilada e a posterior afina-se até terminar em ponta entalhada característica. Possui cutícula delgada e hialina, e logo abaixo há uma camada de gotículas claras, refringentes. A boca é pequena e fechada, os lábios são indistintos, e possui esôfago filariforme (não possui bulbo posterior) aproximadamente da metade do comprimento da L3 e circundado pelo anel nervoso no quarto final. O intestino termina em ânus (MORAES, 1948). Na extremidade anterior da larva filarióide há um sistema de percepção ambiental, formado pelos neurônios labiais e cefálicos, responsáveis pela localização do hospedeiro (ASHTON et al., 1995; ASHTON; LI; SCHAD, 1999).

As proteinases de L3 de *S. stercoralis* fazem-no mais eficiente do que os ancilostomídeos na degradação de elastina e laminina, fato importante na penetração percutânea e migração pelos tecidos (HOTEZ et al., 1990; McKERROW et al., 1990).

S. stercoralis apresenta ciclo evolutivo complexo com fases parasitária e de vida livre. Encontrado o hospedeiro, ocorre a penetração ativa de L3, através da pele ou mucosas, alcançando a circulação linfática ou venosa e chegando aos pulmões. Nos capilares pulmonares, mudam para L4, atravessam o endotélio alveolar, sobem pela árvore brônquica, chegam à faringe, são deglutidas e alcançam o intestino delgado (MANSFIELD et al., 1995; COSTA-CRUZ, 2000).

O período pré-patente, que compreende o intervalo de tempo transcorrido entre a penetração da larva infectante até o aparecimento de larvas rabditóides nas fezes de cães, é de 13 a 19 dias, com um pico de eliminação na terceira semana e o desaparecimento nas fezes em torno de 52 a 68 dias após a infecção (MANSFIELD; SCHAD, 1992).

As larvas transportadas nas fezes chegam até o meio externo e, dependendo das condições encontradas, desenvolverão o ciclo homogônico (direto) ou heterogônico (indireto) (COSTA-CRUZ, 2000).

Dados experimentais, à partir de modelo canino para verificar qual a influência de diferentes fatores ambientais sobre a geração de vida livre, mostram que temperaturas de 25 °C e 30 °C favoreceram o ciclo indireto e o direto, respectivamente; a redução da fonte de alimento (flora bacteriana fecal) favorece o ciclo direto e a imunossupressão não interferiu no direcionamento do ciclo (SHIWAKU et al., 1988).

No ciclo direto, a larva rabditóide alimenta-se da microflora nas fezes e após 48 a 72 horas atinge o estágio de larva filarióide, que não se alimenta, apenas consome as reservas de glicogênio (GROVE, 1996).

No ciclo indireto, as L1 transformam-se em machos e fêmeas de vida livre com nítido dimorfismo sexual. Após o acasalamento inicia-se a postura de ovos larvados, dos quais eclodem larvas rabditóides que desenvolvem para larvas filarióides. O número de

células presentes no primórdio genital auxiliam na determinação da idade das larvas rabditóides (MORAES, 1948; GROVE, 1996; LOPEZ; NOLAN; SCHAD, 2000).

A definição do sexo ocorre durante a embriogênese de acordo com a carga cromossômica, sendo que as larvas rabditóides haplóides, diplóides e triplóides se desenvolverão respectivamente em machos, fêmeas de vida livre e larvas filarióides que evoluirão para fêmeas partenogéticas (COSTA-CRUZ, 2000).

1.2. Epidemiologia da strongiloidíase canina

Os parasitos entéricos de potencial zoonótico dos cães com suas distribuições geográficas são os seguintes: Nematódeos – *Toxocara canis* (cosmopolita), *Ancylostoma* spp. (comum em regiões tropicais e sub-tropicais), *Uncinaria* spp. (Europa e América do Norte), *Strongyloides stercoralis* (regiões tropicais e sub-tropicais); Cestódeos - *Echinococcus* spp. (cosmopolita), *Dipylidium caninum* (cosmopolita), *Spirometra* spp. (Américas do Norte e do Sul); Protozoários – *Giardia* spp. (cosmopolita), *Cryptosporidium* spp. (cosmopolita) (SOULSBY, 1982; ROBERTSON; THOMPSON, 2002).

A faixa etária dos cães que está mais predisposta a infecções parasitárias intestinais compreende-se entre zero e um ano de idade, entretanto ocorre uma maior concentração de casos de cães parasitados entre zero e seis meses de idade, enquanto que aumentando a idade dos cães observa-se uma redução na incidência das parasitoses (ARAUJO et al., 1986; OLIVEIRA et al., 1990; GUIMARAES JUNIOR et al., 1996).

Os cães são susceptíveis às infecções por ancilostomídeos e ascaridídeos em todas as fases de vida, entretanto o nível destas parasitoses é elevado nos filhotes porque o sistema imune destes animais encontra-se em processo de desenvolvimento e há larvas em estado de quiescência alojadas na musculatura da cadela, as quais durante a gestação reativam-se e, através das vias transplacentária e transmamária, conseguem infectar os filhotes nos

períodos pré-natal e de amamentação (BURKE; ROBERSON, 1985; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002).

Pesquisas apontam para uma tendência de redução na incidência das parasitoses intestinais caninas, e elas também sugerem que este fato está relacionado à utilização mais freqüente de anti-helmintícos nos cães, e ao conhecimento adquirido pelos proprietários destes animais, a respeito das medidas de controle das helmintoses (JORDAN; MULLINS; STEBBINS, 1993; BUGG et al., 1999; ROBERTSON et al., 2000).

Alguns dos estudos sobre a prevalência das helmintoses intestinais caninas, utilizando métodos coproparasitológicos ou de necrópsias, e que foram conduzidos em outros países, e também em vários estados brasileiros, são apresentados a seguir, eles também apresentam um perfil das parasitoses gastrointestinais dos cães domésticos que foram diagnosticadas por diferentes métodos e em diferentes regiões geográficas.

Para investigar-se a prevalência de helmintos intestinais caninos em Boksburg, Gauteng, África do Sul, foram colhidas 164 amostras fecais de cães necropsiados, os resultados foram de 88% para *A. caninum*, 39% para *D. caninum*, 36% *T. canis*, 20% para *A. brasiliense*, 14% *Spirocerca lupi*, 9% *Toxascaris leonina*, 6% para *T. vulpis*, 6% de *Joyeuxiella pascualei* e 4% para *Taenia* spp. (MINNAAR, W.N.; KRECEK, R.C., 2001).

Estudo conduzido para pesquisar ovos de helmintos em 490 amostras fecais caninas, que foram colhidas nas regiões oeste e norte da Hungria, demonstraram 24,3 e 30,1% de amostras positivas para *T. canis* em ambas as regiões respectivamente, 20,4 e 23,3% para *T. vulpis*, 8,1 e 13,1% para ancilostomatídeos, 0 e 7,3% para *Capillaria* spp., 2,1 e 0% para *T. leonina*, 2,8 e 2,4% para tenídeos, 0,4 e 1% para *D. caninum* e 3,5 e 3,4% para coccídios (FOK et al., 2001).

Realizou-se estudo com 63 cães de rua, errantes (sem domicílio determinado), na cidade de Bloemfontein, África do Sul. Os animais foram sacrificados e procedeu-se a necrópsia, quando foram colhidas as amostras fecais. Os resultados de incidência encontrados foram de 44% para *D. caninum*, 33% para *Taenia* spp., 32% para *T. leonina*, 27% *A. caninum*, 21% para *T. canis*, 19% *A. brasiliense*, 13% para *S. lupi* e 5% para *Joyeuxiella* sp. (MINNAAR; KRECEK; FOURIE, 2002).

Para se avaliar a função dos cães na transmissão de parasitos gastrintestinais em comunidades produtoras de chá da região nordeste da Índia, foram colhidas amostras de 101 cães, e analisadas utilizando os métodos parasitológicos de sedimentação espontânea e de flotação em sulfato de zinco e nitrato de sódio, também utilizou-se a técnica molecular de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) para diagnóstico de *Ascaris* sp. Os resultados de prevalência obtidos foram de 94% para ancilostomídeos, 40% para *S. lupi*, 31% para *Ascaris* spp., 25% para *Trichuris* spp., 28% para *Spirometra* spp., 17% para *Opisthorchis* spp., 14% para *Taenia* spp., 11% para *T. canis*, 9% para coccídeo, 8% para *Hymenolepis diminuta*, 6% *D. caninum*, 3% para *Sarcocystis* spp., 3% para *Giardia* spp., 2% para *Isospora belli*, 2% para *Gnathostoma spinigerum*, 2% para *Strongyloides* spp., 1% para *Cryptosporidium parvum*, *Paragonimus* spp. e *Entamoeba* spp. (TRAUB et al., 2002).

Em estudo conduzido no estado do Colorado, Estados Unidos da América, para avaliar a prevalência de patógenos intestinais em cães com diarreia, foram analisadas 130 amostras fecais caninas (71 apresentando sintomas e 59 sem sinais clínicos) e a frequência encontrada dos agentes com potencial zoonótico detectados foi de 16,2% dos cães com *Giardia* spp., 3,8% com *C. parvum*, 3,1% com *T. canis*, 2,3% com *Salmonella* spp., 0,8% com *A. caninum* e 0,8% com *Campylobacter jejuni*. Como houveram resultados positivos tanto em cães sintomáticos com em assintomáticos, os autores sugerem que os animais de

proprietários que estão em situações de imunossupressão (HIV, transplantados, gestantes) devem ser avaliados para a presença de agentes zoonóticos entéricos (HACKETT; LAPPIN, 2003).

Estudo conduzido na Alemanha, em 8438 amostras fecais caninas, colhidas no período de 1999 a 2002, e analisadas pelos métodos de flotação, de sedimentação, de Baermann, e de MIFC demonstraram 51,6% de amostras positivas para *Giardia* spp., 22,4% para *T. canis*, 22,3% de *Cystoisospora* spp., 9,0% de *Sarcocystis* spp., 8,6% para ancilostomatídeos, 4,0% de *T. vulpis*, 2,3% para *Capillaria* spp., 1,8% para *T. leonina*, 1,2% de tenídeos, 0,9% para *Crenosoma vulpis*, 0,4% de *D. caninum*, 0,3% de *Angiostrongylus vasorum*, 0,2% de *Mesocestoides* spp., 0,1% de *Diplopylidium* sp. e *Joyeuxiella* sp. (BARUTZKI; SCHAPER, 2003).

Estudo conduzido na cidade de Comodoro Rivadavia, Argentina, em 163 amostras fecais caninas colhidas em praças, para investigar a presença de ovos de helmintos apresentaram 46,6% de positivos, independentes das condições de umidade das fezes. Os ovos de parasitos de potencial zoonótico que foram diagnosticados são *Toxocara* spp., *Taenia* spp., *Echinococcus* spp., *Uncinaria* spp., *Entamoeba* spp. (SANCHEZ THEVENET et al., 2003).

No Japão, em estudo por métodos coproparasitológicos em 1505 amostras fecais caninas, de animais com idade entre um e seis meses, procedentes de cães e lojas de animais de companhia, demonstrou-se 1,93 % de cães parasitados por *S. stercoralis* (ITOH et al., 2003).

Os resultados de incidência das parasitoses caninas, realizado em 1281 amostras fecais, na cidade Hannover, Alemanha, colhidas entre os anos de 1998 e 2002, analisadas utilizando-se métodos coproparasitológicos demonstraram 2,3% das amostras positivas

para *Giardia* sp., 2,3% para *Isospora* sp., 2,2% para *T.canis*, 1,4% para ancilostomídeos, 0,8% para tenídeos, 0,6% para *Crenosoma* sp., 0,2% para *Capillaria* sp., 0,2% para *T vulpis* e 0,2% para *Hammondia* sp. (EPE; COATI; SCHNIEDER, 2004).

Em estudo coproparasitológico na cidade de Tochigi, Japão, foram colhidas 772 amostras fecais caninas, no anos de 1979, 1991 e 2001, e analisadas pelos métodos direto em lâmina e de concentração (willis, sulfato de zinco e centrifugação em gradiente de densidade com glicose). Os resultados de incidência obtidos foram de 27,3, 9,9 e 5,6% para *A. caninum* para os anos de 1979, 1991, 2002 respectivamente, 15,8, 12,2 e 4,4% para *T. vulpis*, 8,5, 6,9 e 5,7% para *T. canis*, 0, 1,5, 1,6% para *S. stercoralis*, 1,9, 3,8 e 2,0% para *D. caninum*, 1,2, 0,8 e 1,2% para *S. erinacei*, 2,3, 3,8 e 0% para *Isospora* spp., 1,9, 5,3 e 1,2% para *Giardia* spp. e 0, 0 e 0,4% para *Cryptosporidium* spp. (ASANO et al., 2004).

A incidência de parasitos intestinais foi investigada em 23 abrigos de animais da Holanda, foram colhidas 227 amostras fecais caninas, sendo que os resultados foram de 8,5% de positivos para *T. canis*, 4,9% para *T. vulpis*, 2,2% para *U. stenocephala*, 1,3% para *D. caninum*, 1,3% para *C. canis*, 1,3% para *C. ohioensis* e 0,5% para *T. leonina*. Os cães na faixa etária de menos de um ano apresentaram os maiores valores de prevalências para os helmintos diagnosticados no estudo (LE NOBEL et al., 2004).

A prevalência de parasitos intestinais em 614 amostras fecais de cães da cidade de Maracaibo, Venezuela, colhidas entre o período de janeiro a dezembro de 2001 e analisadas pelo método de flotação fecal apresentaram 24,5% de positivos para *Ancylostoma* spp., 11,4% para *T. canis* e 8,1% para *Isospora* spp. A incidência dos parasitos foi maior nos cães com menos de um ano de idade e naqueles animais de raça não definida, não houve diferença estatística entre sexos (RAMIREZ-BARRIOS et al., 2004).

Para se determinar a prevalência de parasitoses em cães errantes da cidade de México, México, foram estudados 120 cães, utilizando o método de necrópsia, os resultados de incidência obtidos foram de 60% para *D. caninum*, 2,5% para *T. hydatigena*, 1,6% para *T. pisiformes*, 0,83% para os cestódeos *E. granulosus*, *Mesocestoides vogae* e *M. variabilis*, 62,5% para *A. caninum*, 13,3% para *T. canis* e 4,16% para *T. leonina*. Entre os cães adultos os helmintos mais frequentes nas amostras fecais analisadas foram *D. caninum* e *A. caninum*, enquanto entre os cães jovens o parasito mais diagnosticado foi *T. canis* e também foi o mais comum nas estações secas do ano (EGUIA-AGUILAR; CRUZ-REYES; MARTINEZ-MAYA, 2005).

A prevalência de helmintos em cães, da cidade de Goiânia, Goiás, Brasil, foi estudada em 40 cães, de ambos os sexos, de raça indefinida, com idade variando de dois meses a oito anos, e que necropsiados, sendo que para a pesquisa de *Strongyloides* o segmento proximal do intestino delgado era revertido e colocado suspenso em proveta com água a 45°C. Encontrou-se 92,5% dos cães parasitados por *A. caninum*, 67,5% por *A. brasiliense*, 45% por *D. caninum*, 22,5% por *S. lupi*, 17,5% por *T. canis* e 2,5% parasitados por *S. stercoralis* (CARNEIRO et al., 1973).

Para avaliar a incidência de helmintoses caninas na região da cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, foram estudadas 437 amostras de fezes de cães, de ambos os sexos, com idades variando de três meses e 11 anos e de diferentes raças, atendidos no Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, no período compreendido entre os anos de 1979 a 1983. O método para pesquisa de ovos de helmintos foi o de sedimentação e os resultados encontrados foram 49,65% de incidência para *Ancylostoma* spp., 9,15% para *Toxocara*, 6,93% para *Dipylidium* spp., e 1,15% para *Trichuris* spp. (ARAÚJO et al., 1986).

Estudo realizado na cidade de Vitória, Espírito Santo, Brasil, no ano de 1990, com 61 cães de ambos os sexos, adultos e examinados em necropsia, demonstrou-se a ocorrência dos seguintes enteroparasitos: *A. caninum* (88,5%), *A. brasiliense* (70,5%), *D. caninum* (36,0%), *Trichuris vulpis* (24,5%), *D. immitis* (16,3%), *Phagicola arnaldoi* (14,7%), *S. lupi* (14,7%), *T. canis* (3,2%), *Taenia* spp (1,6%), *Strongyloides* spp (1,6%) (COSTA et al., 1990).

Em estudo coproparasitológico de 11.563 cães de ambos os sexos, de várias raças, com diferentes idades, no período compreendido entre os anos de 1981 a 1986, na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil e examinados pelo método direto em lâmina, demonstrou-se 21,16% de animais parasitados, sendo 68,32% infecções simples e 30,85% infecções múltiplas. Sendo que as prevalências de *Ancylostoma* spp. de 61,15%, *Toxocara* spp. de 24,25%, *Dipylidium* spp. de 8,28%, *Isospora* spp. de 4,62%, *Trichuris* spp. de 1,22%, *Taenia* spp. 0,22%. Foi observado também que os parasitos *Ancylostoma* spp. e *Toxocara* spp., a partir de 1984, demonstravam uma tendência decrescente em suas incidências (OLIVEIRA et al., 1990).

Das 889 amostras de fezes provenientes de cães de diferentes raças e faixas etárias, atendidos pelo Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, no período de janeiro de 1982 a dezembro de 1992, onde foram utilizados os métodos de Willis e Hoffman, Pon & Janer, 39,82% estavam positivas para *Ancylostoma* spp., 13,72% para *Toxocara* spp., 6,74% para *Trichuris* spp. e 3,82% para *Dipylidium* spp. (GUIMARAES JUNIOR et al., 1996).

Com objetivo de retratar-se a ocorrência de endoparasitos em cães domiciliados de diferentes áreas da cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil foram analisadas 353 amostras fecais caninas, de ambos os sexos e com raças e idades variadas, no período entre janeiro de

1991 a janeiro de 1995. Os resultados obtidos no estudo foram 20,4% de incidência para *Ancylostoma* spp., 8,49% para *T. canis*, 7,65% para *Giardia* sp., 2,83% para *C. parvum*, 2,55% para *Cystoisospora* spp., 1,70% para *Sarcocystis* spp., 0,85% para *Hammondia heydorni*, 0,28% para *D. caninum*, 0,28% para *S. lupi* e 0,28% para *T. vulpis* (GENNARI et al., 1999).

Os resultados coproparasitológicos de 105 cães domiciliados, de ambos os sexos, com idades variadas, procedentes da cidade de Uberlândia, e que foram avaliados pelos métodos de flutuação em solução hipersaturada de cloreto de sódio (Willis), sedimentação espontânea (Hoffmann-Pons-Janer) e esfregaço de fezes corado pelo Ziehl-Neelsen mais H₂O₂, demonstraram frequências de 9,52% para *T. canis*, 5,71% para ancilostomatídeo, 2,85% para *Isospora* sp., 1,90% para *C. parvum* e 0,95% para *Sarcocystis* sp. (MUNDIN; CABRAL; FARA, 2001).

Para determinar a prevalência de parasitos gastrintestinais em cães errantes e em cães domiciliados da cidade de São Paulo, foram colhidas 271 amostras fecais caninas, de diferentes idades, de ambos os sexos, no período de agosto de 1999 a novembro de 2000. Os cães foram necropsiados e colheram-se as amostras de fezes, e analisaram-se pelos métodos de Faust, de Willis e de sedimentação. A prevalência encontrada foi de 23,62% para *Ancylostoma* spp., 12,18% para *Giardia* spp., 8,49% para *Cystoisospora* spp., 5,54% para *T. canis*, 4,80% para *T. vulpis*, 2,58% para *H. heydorni*, 2,21% para *Sarcocystis* spp., 1,85% para *S. lupi*, e 0,74% *D. caninum*. A frequência de infecção por *Ancylotoma* spp. e *Toxocara* spp., segundo a idade dos cães foi de 48,1% e 22,2% nos animais jovens (até seis meses) de ambos os sexos, e nos adultos (acima de seis meses de idade) foi de 28,2% e 6,8% nos machos e de 15,6% e 1,4% nas fêmeas, para ambos helmintos respectivamente (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002).

Estudo realizado na cidade de Itapema, Santa Catarina, em amostras fecais de 158 cães, de idades variadas e de ambos os sexos, apreendidos em logradouros públicos pela vigilância sanitária, no período de agosto de 2003 a maio de 2004, sendo que as amostras foram analisadas pelo método de sedimentação espontânea, com a confecção de duas lâminas à partir do sedimento com posterior leitura. Demonstrou-se 70,9% das amostras positivas para *Ancylostoma* spp., 14,5% para *T. canis*, 13,9% para *T. vulpis*, 6,3% para *Isoospora* spp., e 1,9% *D. caninum* (BLAZIUS et al., 2005).

Sobre o tema estrogiloidíase canina, foram consultadas as bases de dados Pubmed, Scielo, Revista do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária e Google.

S. stercoralis infecta cães (*Canis familiaris*), gatos (*Felis catus*), gerbils (*Meriones unguiculatus*), e o homem (*Homo sapiens*) (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

A prevalência de *S. stercoralis* varia de acordo com a área geográfica que está sendo estudada, ocorrendo maior número de infectados nas regiões tropicais. A estrogiloidíase é rara na Europa, ocorrendo em áreas restritas de Portugal, Itália, Romênia e países da região do Báltico. Nos Estados Unidos da América, na áreas rurais dos estados de Kentucky e Tennessee, a prevalência varia de 0,4 a 4% em exames de fezes. Alguns dos países que apresentam casos de estrogiloidíase humana são a Nigéria com uma prevalência de 25,1%, o Laos 19%, a Etiópia 13, o México 2,0% e a Argentina 2,0% (FERREIRA, 2003).

A prevalência da estrogiloidíase humana no Brasil é de 2,1%, e apresenta variações regionais dependendo do local do inquérito. Em Minas Gerais, no ano de 1996, a prevalência de *S. stercoralis* foi de 2,1%, enquanto no ano de 2002 em estudo realizado com pacientes portadores da síndrome de deficiência imunológica adquirida, no estado de Minas Gerais a prevalência foi de 12% nos testes parasitológicos (FERREIRA, 2003).

Em Uberlândia, cidade situada no Triângulo Mineiro, Minas Gerais, utilizando-se métodos coproparasitológicos, detectou-se, para a estrogiloidíase humana, uma prevalência de 13% entre crianças que permaneciam em creches, sendo a cidade considerada uma região hiperendêmica para *S. stercoralis* (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998).

A incidência da estrogiloidíase canina, utilizando-se métodos coproparasitológicos para diagnosticar o helminto, apresentou valores de 2% na Índia, 1,93% e 1,6% ambos no Japão (TRAUB, et al., 2002; ITOH et al., 2003; ASANO et al., ASANO et al., 2004).

Segundo dados obtidos no Brasil, à partir de cães que foram submetidos a necrópsia, os valores de incidência para a estrogiloidíase canina variam de 1,6 a 2,5% (CARNEIRO et al., 1973; COSTA et al., 1990).

A estrogiloidíase canina é um problema de canis nos Estados Unidos da América, ocorrendo durante as épocas de calor e umidade elevados, afetando mais severamente os filhotes, sendo que as larvas filarióides de *S. stercoralis* à partir de fezes caninas podem infectar o homem e vice-versa (HENDRIX; BLAGBURN; LINDSAY, 1987; ROBERTSON; THOMPSON, 2002; TRAUB et al., 2002). Um relato médico na cidade de Nova Iorque demonstrou a ocorrência de um caso de estrogiloidíase humana adquirida à partir de fezes contaminadas com larvas de *S. stercoralis*, de cães que ficavam alojados em canil (GEORGI; SPRINKLE, 1974).

S. stercoralis de diferentes regiões geográficas apresentam variação na virulência e na capacidade de invadir o hospedeiro canino (HENDRIX; BLAGBURN; LINDSAY, 1987). FULLEBORN (1914), infectou cães com larvas filarióides originárias da China, mas em outro estudo com larvas do Oeste da África, os cães demonstraram-se refratários à infecção.

As larvas filarióides têm um período de vida curto no ambiente fora do hospedeiro e estão sujeitas a alguns tropismos: geotropismo negativo (movimento de ascensão das larvas pelas superfícies que as impelem a abandonar o solo), histotropismo positivo que é o fator determinante na penetração das larvas infectantes através da pele e está associado ao termotropismo e o hidrotropismo positivos (MORAES, 1948; FORTES, 1997).

O nematódeo *S. stercoralis* não possui larvas em estado de quiescência na musculatura da cadela que possam ser transmitidas aos filhotes durante a gestação. Na estrogiloidíase canina a transmissão vertical pela via transplacentária não é utilizada pelo parasito; entretanto, se a cadela infectar-se nos três primeiros dias pós-parto, a via transmamária ocorrerá como rota de infecção para os filhotes lactantes (SHOOP et al., 2002).

A infecção crônica por *S. stercoralis*, pode ocorrer em aproximadamente um terço dos cães infectados, e supõe-se que esta incapacidade de eliminar o parasito seja geneticamente controlada, enquanto a auto-cura com resistência à reinfeção ocorre nos dois terços restantes da população canina infectada (GROVE; NORTHERN, 1982).

Na autoinfecção interna as larvas rabditóides de *S. stercoralis*, ainda na luz intestinal de cães infectados, transformam-se em L3 que penetram a mucosa intestinal (íleo e cólon), sendo que este é um dos mecanismos utilizados pelo parasito para cronificar a estrogiloidíase canina por vários meses ou anos (GROVE; NORTHERN, 1982, COSTA-CRUZ, 2000).

Na estrogiloidíase canina, a autoinfecção sem aumento do número de fêmeas parasitas pode ocorrer em cães imunologicamente normais; entretanto, quando esses cães são intensamente imunossuprimidos a hiperinfecção e a disseminação podem ser provocadas (SCHAD; HELLMAN; MUNCEY, 1984). Durante a hiperinfecção há uma

elevação do número de parasitos no intestino, encontrando-se larvas e adultos no estômago e intestino grosso, e durante a disseminação encontram-se larvas de *S. stercoralis* em locais ectópicos (SCHAD, HELLMAN; MUNCEY, 1984).

Em um estudo sobre disseminação em cães imunossuprimidos, detectaram-se grande número de larvas filarióides de *S. stercoralis* nos pulmões, tanto nos alvéolos como nos brônquios, e também no baço, nos rins e na bexiga, sendo que nesses órgãos elas eram rabditóides sugerindo uma infecção local (GROVE; HEENAN; NORTHERN, 1983).

1.3. Aspectos clínicos e imunológicos da estrogiloidíase canina

A estrogiloidíase canina têm três possibilidades de evolução para a doença nos cães infectados: a auto-cura, a cronicidade decorrente da auto-infecção e a possibilidade de hiperinfecção ou disseminação. Estes fatores estão na dependência do sistema imune do hospedeiro e da capacidade de evasão do parasito (GROVE; NORTHERN, 1982; GROVE; HEENAN; NORTHERN, 1983; SCHAD; HELLMAN; MUNCEY, 1984).

A estrogiloidíase canina pode ser assintomática ou apresentar-se com sintomas clínicos dermatológicos, gastrointestinais e respiratórios (ROBERTSON; THOMPSON, 2002). Os sintomas iniciais incluem anorexia e tosse; diarreia desenvolve-se poucos dias depois do início da tosse. As fezes são aquosas e podem conter sangue e muco. A infecção percutânea pode causar dermatite focal (MALONE et al., 1980; STROMBECK; GUILFORD, 1995). Vômito e diarreia intensos, hemorragias alveolares e septicemia são achados da síndrome de disseminação (GROVE; HEENAN; NORTHERN, 1983).

Na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, relatou-se o caso de um cão da raça Yorkshire, fêmea, 40 dias de idade, procedente de um canil da cidade de Campo Belo, MG, apresentado para consulta em clínica veterinária, manifestando febre, vômito, emaciação, diarreia recorrente e crises convulsivas. Ao exame coproparasitológico, pelos métodos de

Willis e direto em lâmina, detectou-se larvas rabaditóides que apresentavam características morfológicas de *S. stercoralis*. À necropsia, realizou-se raspado da mucosa do intestino delgado e grosso, o material foi corado e montaram-se lâminas que foram analisadas utilizando microscopia óptica, diagnosticando-se fêmeas partenogénicas, larvas rabaditóides, filarióides e ovos de *S. stercoralis* (FERREIRA JUNIOR et al., 2004).

Embora o sistema imune se encontre completamente desenvolvido no momento do nascimento, é insensato se esperar que ele funcione nos níveis de animais adultos completos por várias semanas. O desenvolvimento completo da capacidade imune depende da estimulação antigénica (TIZARD, 2000).

Qualquer resposta imune montada por um animal recém-nascido deve ser uma resposta primária com um período de intervalo prolongado e concentrações baixas de anticorpos. Portanto, a menos que seja providenciada uma assistência imunológica, os animais recém-nascidos podem ser mortos por organismos que apresentam pouca ameaça para um adulto. Essa assistência imunológica é proporcionada pelos anticorpos transferidos da mãe para o seu descendente através do colostro (TIZARD, 2000).

Os cães possuem uma placenta endoteliocorial, na qual o epitélio coriônico fica em contato com o endotélio dos capilares maternos. Nessa espécie, uma pequena quantidade de IgG (5 a 10%) pode se transferir da mãe para o filhote, mas a maior parte dela é obtida através do colostro. A composição de imunoglobulinas presentes no colostro da cadela é de 500 a 2200 mg/dL de IgG, 150 a 340 mg/dL de IgA e 70 a 370 mg/dL de IgM, enquanto a composição do leite é 110 a 620 mg/dL de IgA, 10 a 54 mg/dL de IgM e 10 a 30 mg/dL de IgG (TIZARD, 2000).

Em geral a permeabilidade intestinal para as imunoglobulinas é maior imediatamente após o nascimento e declina após 6 horas, talvez devido às células intestinais que absorvem

imunoglobulinas serem substituídas por uma população de células mais maduras não absorventes. Como regra, a absorção de todas as classes de imunoglobulinas terá um declínio para níveis relativamente baixos em aproximadamente 24 horas (TIZARD, 2000).

Existem três razões principais para a falha de uma transferência de colostro adequada. Em primeiro lugar, a mãe deve produzir colostro insuficiente ou de má qualidade (falha de produção). Em segundo lugar, pode existir um colostro suficiente produzido, mas um consumo inadequado por parte do animal recém-nascido (falha de ingestão). Em terceiro lugar, pode existir uma falha de absorção intestinal apesar de um consumo adequado de colostro (falha de absorção) (TIZARD, 2000).

A resposta imune na estrogiloidíase canina foi investigada em animais com idade entre seis e oito semanas de vida, infectados experimentalmente e detectou-se nas infecções primárias que os anticorpos IgM anti- *S. stercoralis* aparecem no soro uma semana após a infecção, com um pico de título na terceira semana e em seguida diminuem gradativamente. Os anticorpos IgG anti- *S. stercoralis* aparecem duas semanas pós-infecção (PI), os títulos máximos surgem seis semanas PI e permanecem elevados até as primeiras 20 semanas PI. No teste utilizando o mitógeno fitohemaglutinina não ocorreu supressão de linfócitos sanguíneos periféricos, procedentes dos cães infectados e também não houve estimulação significativa destas células pelos antígenos de *S. stercoralis*. Não detectou-se as reações de Arthus (cinco horas) e de hipersensibilidade tardia (24 horas), mas foi observada intensa reação de hipersensibilidade imediata (15 minutos) após a aplicação por via intradérmica do antígenos (GROVE, NORTHERN, 1982).

Em estudo com cães de oito semanas de idade, infectados experimentalmente com *S. stercoralis* e deficientes em IgA específica, demonstrou-se que no período pré-patente o número máximo de larvas eliminadas nas fezes e o tempo necessário para interromper a

eliminação das larvas não modificaram-se nos cães imunodeficientes. Sintomas clínicos, laboratoriais e os níveis de anticorpos IgM e IgG anti- *S. stercoralis* mantiveram-se inalterados (MANSFIELD; SCHAD, 1992).

Os cães são relativamente resistentes à imunossupressão com corticóides. Entretanto considerável supressão da resposta de linfócitos a mitógenos é produzida quando prednisolona é dada na dose de 1 mg/kg diariamente, e a completa supressão ocorre quando é dada uma dose de 10 mg/kg. As observações feitas em cães que não foram imunossuprimidos demonstraram que quatro semanas pós-infecção (PI), o título médio de IgG específico anti-*S. stercoralis* foi aproximadamente 1 : 64, e na 20^a semana PI o título foi de 1 : 128. Depois do início da imunossupressão, os níveis de anticorpos declinaram e na 24^a semana PI, o título de IgG específico foi 1 : 16 (GROVE; HEENAN; NORTHERN, 1983).

1.4. Métodos diagnósticos da estrogiloidíase canina

O diagnóstico parasitológico de *S. stercoralis* realiza-se através dos exames de flotação fecal, Baermann e esfregaço direto de fezes frescas, investigando-se a presença de ovos, larvas rabditóides ou filarióides do parasito, respectivamente (HENDRIX et al., 1987).

Para aumentar a sensibilidade dos métodos parasitológicos com fezes, realiza-se cultura misturando-se partes iguais de fezes e vermiculita, incuba-se a 25°C por 7 dias, e então realiza-se o Baermann (MALONE et al., 1980).

Uma vez que a detecção deste helminto por métodos parasitológicos nas fezes dos cães é difícil, a investigação de anticorpos específicos em amostras de soro pode contribuir auxiliando o diagnóstico. No imunodiagnóstico de estrogiloidíase canina os métodos já utilizados são a imunofluorescência em tubo para detectar anticorpos IgM e IgG (GROVE;

NORTHERN, 1982); teste de reação intradérmica (GROVE; NORTHERN, 1982) e imunodifusão radial para IgM, IgG e IgA (MANSFIELD; SCHAD, 1992).

Os principais antígenos de helmintos são de dois tipos, antígenos fixados na superfície de parasitas (antígenos somáticos, cutícula) e produtos solúveis de excreção ou secreção. O teste de imunodiagnóstico IFAT detecta anticorpos contra antígenos da superfície do parasito, e o teste imunoenzimático ELISA pode detectar anticorpos contra antígenos solúveis de larva filarióide (TIZARD, 2002).

Para a detecção de anticorpos específicos na estrogiloidíase humana, utilizam-se os testes de imunofluorescência indireta (IFAT) em lâminas (COSTA-CRUZ et al., 1997) e o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (GAM; NEVA; KROTOSKI, 1987; CONWAY et al., 1993; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995).

A reação de imunofluorescência indireta, utilizando antígeno particulado do parasito, foi descrita como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da estrogiloidíase humana (MACHADO et al., 2001).

O teste ELISA tem sido utilizado na detecção de IgG anti-*S. stercoralis* nas infecções humanas (LINDO et al., 1994; KOOSHA; FESHARAKI; ROKNI, 2004).

Não há na literatura consultada dados a respeito da utilização do IFAT com antígeno particulado em lâminas e do ELISA com extrato salino homólogo, na detecção de anticorpos específicos anti-*S. stercoralis* em amostras de soros de cães domésticos.

2 – OBJETIVOS

Proceder ao diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase e dos demais parasitas intestinais utilizando os métodos de Baermann e de Lutz, em amostras de fezes de cães domésticos.

Detectar anticorpos específicos anti-*S. stercoralis* em amostras de soros de cães domésticos, utilizando o teste de imunofluorescência indireta (IFAT) em lâminas, com antígeno particulado homólogo.

Detectar anticorpos específicos anti-*S. stercoralis* em amostras de soros de cães domésticos, utilizando o teste imunoenzimático ELISA, com extrato salino homólogo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados segundo as normas para experimentação animal propostas pelo CIOMS (1985). Os resultados de todos os testes foram informados aos proprietários dos cães.

3.2. Localidades e Cães

A cidade de Uberlândia localiza-se na região nordeste do Triângulo Mineiro, estado de Minas Gerais, microregião 170 CNE (Conselho Nacional de Estatística), nas coordenadas geográficas de latitude 18° 55'23" S e longitude 48° 17'19" (Greenwich).

A cidade de Araxá localiza-se no Sudoeste Mineiro, na zona geográfica do Alto Paranaíba, estado de Minas Gerais na latitude 19° 35'S e longitude 46° 55'W.

A cidade de Campo Belo localiza-se no Sudoeste Mineiro, na região do Campo das Vertentes, estado de Minas Gerais na latitude 20° 53'30"S e longitude 45° 16'15"O.

Calculou-se o número dos cães estudados segundo RODRIGUES (1986), $n = Z^2 \times P \times Q / d^2$, sendo $Z = 95\%$ o intervalo de confiança, com valor tabelado de 1,69; $P = 13\%$ a prevalência estimada (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998); $Q = 87\%$ o valor de casos não encontrados e $d = 5\%$ a precisão determinada pelo pesquisador. O "n" calculado foi de 174 cães, sendo que a amostra foi ampliada para 215 cães.

Os 215 cães estudados foram das raças Shitzu (37); Maltês (22); Yorkshire (21); Schnauzer (14); Lulu (11); Pug (11); Beagle (10); Lhasa Apso (9); Sharpei (8); Chow-Chow (5); Bull Dog (5); Basset Hound (3); Poodle (4); Mastin Napolitano (2); Rotweiller (2); Pit Bull (1); Scotch terrier (1); Doberman (1) e sem raça definida (S.R.D.) (48), sendo 71 machos e 144 fêmeas, com idades entre um mês e sete anos, procedentes de canis comerciais de Uberlândia (84), Araxá (14), Campo Belo (70) e do canil da Associação de

Proteção Animal de Uberlândia (47), estado de Minas Gerais, Brasil, no período de janeiro de 2004 a março de 2005. Os cães foram distribuídos de acordo com a idade, segundo informações dos criadores, nos seguintes grupos: Grupo I (1 a 2 meses; 19 machos e 20 fêmeas), Grupo II (> 2 meses a 1 ano; 11 machos e 20 fêmeas) e Grupo III (> 1 a 7 anos; 41 machos e 104 fêmeas). Cães de um a dois meses de idade (filhotes) estavam na fase de aleitamento materno e início do desmame, acima de dois meses a um ano compreendia o período de desmame até a puberdade (cães jovens) e acima de um ano a sete anos correspondia à fase adulta (GRANDJEAN; VAISSAIRE ; VAISSAIRE , 2001).

3.3. Amostras de fezes e soros

De cada cão colheu-se três amostras de fezes frescas, utilizando-se espátulas de madeira e luvas descartáveis, imediatamente após a defecação, e em dias consecutivos. Utilizou-se frascos plásticos com tampa sem solução conservante para o método de Baermann (1917) e frascos plásticos contendo formalina à 10%, homogeneizando-se as fezes, para o método de Lutz (1919). Os recipientes foram identificados com o nome do animal (quando havia), procedência, sexo, idade, data da colheita e número de seqüência da amostra.

Colheu-se de cada cão 1 mL de sangue, utilizando-se agulhas hipodérmicas 25x7, seringas de 3 mL, tubos de colheita sem anti-coagulante, luvas de procedimento, material de anti-sepsia, sendo todos estes materiais estéreis e descartáveis. Para a colheita punccionou-se a veia jugular em filhotes e cães de pequeno porte, e a veia cefálica em cães de médio e grande porte. Após a punção e a coagulação, centrifugou-se a amostra de sangue em 350 x g por cinco minutos e o soro foi estocado a -20°C para posterior utilização.

A amostra de soro controle positivo foi obtida de cão com infecção natural eliminando larvas nas fezes, e as três amostras de soros controles negativos foram obtidas de cães que apresentaram três exames de fezes consecutivos negativos pelos métodos de Baermann (1917) e de Lutz (1919).

3.4. Diagnóstico parasitológico

3.4.1. Método de Baermann (1917)

Cinco gramas de fezes foram colocadas numa gaze dobrada em quatro sobre uma tela metálica com 100 malhas por cm^2 . Em seguida, colocou-se o material assim preparado num funil de vidro, com diâmetro de 11,5 cm em cuja haste foi colocada uma mangueira de borracha de 10 cm, obliterada com pinça, contendo água a 45°C até a borda, então a gaze com o material fecal em contato com a água foi deixada em repouso por uma hora.

Findo esse tempo, coletou-se 2 mL de água abrindo-se a pinça que obliterava a mangueira de borracha. A água foi colhida em tubo de vidro e centrifugada a $350 \times g$, 5 minutos. O sedimento foi colhido e depositado em uma lâmina de vidro e coberto por uma lamínula (24x24 mm) para exame em microscópio óptico (Olympus, Ch-2, Japão) nos aumentos de 100 e 400 vezes.

3.4.2. Método de Lutz (1919)

Dois gramas de fezes foram colocadas em um “becker” com cerca de 5 mL de água e triturados com bastão de vidro. Em seguida acrescentou-se 20 mL de água, filtrando a suspensão resultante para um cálice cônico de 200 mL de capacidade, utilizando-se uma tela de náilon com cerca de 80 a 100 malhas por cm^2 com gaze cirúrgica dobrada em quatro.

Os resíduos contidos na gaze foram lavados com 20 mL de água sob agitação constante com bastão de vidro, sendo o líquido da lavagem recolhido no mesmo cálice e

completado com água para 200 mL. Esta suspensão de fezes permaneceu em repouso durante 24 horas; findo esse tempo uma gota do sedimento foi colocada em uma lâmina de microscopia com uma gota de lugol, homogeneizado, coberto por uma lamínula (24 x 24 mm) e examinado em microscópio óptico (Olympus CH-2, Japão) em aumento de 100 e 400 vezes.

3.5. Diagnóstico imunológico

3.5.1. Obtenção de *Strongyloides stercoralis*

As larvas de *S. stercoralis* para a produção de antígenos foram obtidas a partir de fezes humanas e mantidas em um cão macho, de raça indefinida, com 60 dias de idade, previamente vermifugado utilizando-se uma associação entre Praziquantel, Pamoato de Pirantel e Fenbendazole, e vacinado, segundo esquemas rotineiramente adotados em clínicas veterinárias. O animal ficou alojado individualmente em gaiola e recebeu água e ração *ad libitum*. Uma semana depois, foi sedado e após tricotomia e anti-sepsia da região inguinal foi inoculado, por via subcutânea, com 6.000 L3, e iniciou-se o tratamento com prednisona na concentração de 2 mg/Kg/dia, via oral (GROVE; NORTHERN, 1982; GROVE et al., 1983). Após 15 dias de infecção, as fezes foram misturadas (v/v) com vermiculita e incubadas em estufa de cultura (B.O.D., Fanem, São Paulo) a 25°C e 70% de umidade por sete dias (MALONE et al., 1980). As larvas foram recuperadas pelo método de Baermann (1917), lavadas por três vezes em solução salina tamponada com fosfatos (0,01M) (PBS) a 350 x g por cinco minutos e o sedimento final foi conservado a -20°C.

3.5.2. Produção do antígeno particulado

O antígeno particulado foi produzido a partir de 100.000 larvas L3 de *S. stercoralis* liofilizadas conforme descrito (COSTA-CRUZ et al., 1997). Em resumo, as larvas foram trituradas em etanol a -18°C e centrifugadas a 1.110 x g por cinco minutos a 4°C. O

sedimento foi lavado com éter anidro e centrifugado duas vezes, ressuspendido com PBS contendo formalina a 3 % e incubado por 24 horas a 37°C. Após centrifugação, o material foi lavado com solução salina e ressuspendido em água destilada contendo soro normal de cabra a 0,5%. O antígeno particulado foi depositado em lâminas de vidro, 26 mm x 76 mm, desengorduradas e demarcadas, as quais permaneceram 18 horas à temperatura ambiente e foram posteriormente conservadas a - 20°C.

3.5.3. Produção de antígeno salino

O antígeno salino foi produzido a partir de 150.000 L3 de *S. stercoralis* conforme metodologia descrita (RODRIGUES et al., 2004). Em resumo, as larvas foram ressuspendidas em PBS e trituradas em homogeneizador de tecidos (Nova Técnica, Brasil) por cinco ciclos de um minuto, e subsequente em ultrassom (Thornton, Brasil) por oito ciclos de 20 segundos em banho de gelo. A suspensão foi incubada por 18 horas a 4°C sob agitação lenta e, em seguida, centrifugada a 12.400 x g por 30 minutos a 4°C. O conteúdo protéico foi dosado pelo método de LOWRY et al. (1951).

3.5.4. Testes para a detecção de anticorpos anti-*S. stercoralis*

Os testes sorológicos IFAT, usando antígeno particulado, e ELISA, usando antígeno salino, foram utilizados para detectar anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* em 215 amostras de soros de cães. Experimentos preliminares foram realizados para determinar as condições ótimas para IFAT e ELISA, através de titulação em bloco dos reagentes (antígenos, soros controles e conjugados).

3.5.4.1. Teste de Imunofluorescência Indireta (IFAT)

IFAT foi realizado de acordo com MACHADO et al. (2001). As lâminas contendo o antígeno particulado foram incubadas com os soros dos cães na diluição ideal de 1:40 por 30 minutos a 37°C e então lavadas por três vezes em PBS por cinco minutos. Em seguida,

foi adicionado o conjugado anti-IgG de cão marcado com isotiocianato de fluoresceína (Biomanguinhos, Brasil) no título ideal de 30 em PBS contendo azul de Evans a 3% por 30 minutos a 37°C. Após lavagens como anteriormente descrito, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH 8,5) e examinadas em microscópio Olympus BH-2-RFC (Japão) nos aumentos de 200 e 400 vezes. Os soros positivos foram titulados em diluições duplas seriadas para determinar o título final de anticorpos.

3.5.4.2. Teste ELISA

ELISA foi realizado conforme protocolo descrito por Silva et al. (2003). Placas de poliestireno (DIFCO, Interlab, Brasil) foram sensibilizadas por 18 horas a 4°C com 50 µl de extrato salino de *S. stercoralis* (5µg/ml) em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M (pH 9,6). Após três lavagens em PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), os sítios ativos foram bloqueados com 50 µl de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em PBS-T por uma hora a 37°C. Após lavagens, as placas foram incubadas com 50 µl dos soros na diluição ideal de 1:100 por 45 minutos a 37°C. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com 50 µl do soro de coelho contendo anticorpos anti-IgG de cão conjugado à peroxidase (preparado segundo Wilson e Nakane, 1978) no título ideal de 200 por 45 minutos a 37°C. A reação foi revelada pela adição do substrato enzimático (H₂O₂ 30% e orto-fenilenediamina [OPD] em tampão citrato fosfato 0,1M pH 5,0) e incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 25 µl de H₂SO₄ 2N, e a densidade óptica (DO) determinada a 490 nm, utilizando leitor de placas (Metrolab-980, Argentina). Os resultados foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE), segundo a fórmula: $IE = (DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off})$, sendo o *cut off* estabelecido como a média dos

valores de DO obtidos de três soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Foram considerados positivos os soros com IE > 1,0.

3.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism versão 3.0 (Graph Pad Software, Inc). Níveis de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* encontrados nos diferentes grupos de cães foram comparados pelo teste *t* de Student e a porcentagem de soropositividade foi analisada pela diferença entre duas proporções. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico parasitológico

Analisaram-se, pelos métodos de Baermann (1917) e de Lutz (1919), três amostras de fezes de cada cão, e a leitura das lâminas foi realizada por dois observadores, totalizando 1.290 avaliações das fezes caninas.

A Tabela 1 mostra os resultados dos exames parasitológicos em fezes de cães de acordo com os diferentes grupos etários.

Tabela 1. Resultados de exames parasitológicos utilizando os métodos de Baermann e de Lutz em fezes de cães, distribuídos de acordo com a idade nos grupos: G I (um a dois meses), G II (> dois meses a um ano) e G III (> um ano a sete anos).

PARASITOS	G I (n=39) n+ (%)	G II (n=31) n+ (%)	G III (n=145) n+ (%)	Total (n=215) n+ (%)
<i>Ancilostomídeo</i>	19 (48,7)*	1 (3,2)	11 (7,6)*	31 (14,4)
<i>Ascaridídeos</i>	21 (53,8)*	0	4 (2,8)*	25 (11,6)
<i>Giardia</i> spp.	3 (7,7)	2 (6,5)	11 (7,6)	16 (7,4)
<i>Cystoisospora</i> spp.	7 (17,9)*	0	5 (3,4)*	12 (5,6)
<i>S. stercoralis</i>	1 (2,6)	0	1 (0,7)	2 (0,9)
<i>Trichuris vulpis</i>	0	1 (3,2)	0	1 (0,5)

n+ = número de casos positivos; (%) = porcentagem de positivos

* $p < 0,05$ em relação ao n total por parasito.

Dos 215 cães, 63 (29,3%) apresentaram-se positivos para enteroparasitos, sendo 32/39 (82,1%) no grupo I, 4/31 (12,9%) no grupo II e 27/145 (18,6%) no grupo III. Biparasitismo foi encontrado em 24/215 (11,2%) cães, ocorrendo em 19/39 (48,7%) cães

do grupo I, nenhum caso no grupo II e 5/145 (3,4%) no grupo III. *S. stercoralis* foi detectado em 2/215 (0,9%), sendo um cão (2,6%) do grupo I (procedente de Araxá) e um cão (0,7%) do grupo III (procedente de Uberlândia). No primeiro caso, o helminto foi diagnosticado na primeira amostra de fezes, pelos métodos de Baermann (1917) e de Lutz (1919), e na terceira amostra pelo método de Baermann (1917); no segundo caso, também na primeira e terceira amostras, o parasito foi detectado pelo método de Lutz (1919).

A Tabela 2 mostra os resultados dos exames parasitológicos em fezes de cães de acordo com as raças.

Tabela 2. Frequência de enteroparasitos em 215 amostras de fezes de cães, divididos em raças.

Parasitos	RP n = 167 n+ (%)	SRD n = 48 n+ (%)
Ancilostomídeo	4 (2,4)*	27 (56,3)*
Ascaridídeos	4 (2,4)*	21 (43,8)*
<i>Giardia</i> spp.	13 (7,8)	3 (6,3)
<i>Cystoisospora</i> spp.	0	12 (25)*
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2 (1,2)	0
<i>Trichuris vulpis</i>	1 (0,6)	0

RP = Raça Pura; SRD = Sem raça definida

n+ = número de casos positivos; (%) = porcentagem de positivo

Das 19 raças puras os ancilostomídeos ocorreram nos Shitzu (n=3) e Pug (1); *T. canis* foi detectado nos Beagle (3) e Schnauzer (1); *Giardia* spp. foi o parasito mais freqüente, sendo encontrado nas raças Shitzu (4), Yorkshire (1), Maltês (1), Beagle (3), Pug (2) e Sharpei (2); um caso de *T. vulpis* foi detectado na raça Doberman; e *S. stercoralis* foi detectado nas raças Shitzu (1) e Pit Bull (1), respectivamente nos grupos I e III.

A Tabela 3 mostra os resultados dos exames parasitológicos das fezes de 215 cães de acordo com a raça e o sexo.

Tabela 3. Diagnóstico parasitológico em amostras de fezes de 215 cães, divididos em grupos de acordo com a raça e o sexo.

Parasitos	RP		SRD	
	M n = 49 n+ (%)	F n = 118 n+ (%)	M n = 22 n+ (%)	F n = 26 n+ (%)
Ancilostomídeo	2 (4,1)	2 (1,7)	14 (63,6)	13 (50)
Ascaridídeo	2 (4,1)	2 (1,7)	11 (50)	10 (38,5)
<i>Giardia</i> spp.	5 (10,2)	8 (6,8)	1 (4,5)	2 (7,7)
<i>Cystoisospora</i> spp.	0	0	5 (22,3)	7 (26,9)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2 (4,1)*	0	0	0
<i>Trichuris vulpis</i>	0	1 (0,8)	0	0

R.P. = Raça Pura; S.R.D. = sem raça definida; M = macho; F = fêmea
n+ = número de positivos; (%) = porcentagem de positivos

O número maior de fêmeas em relação aos machos, nas raças puras, se deve ao fato de que nos canis visitados, um cão reprodutor fica disponível para a cobertura de até cinco matrizes.

A Tabela 4 apresenta os resultados dos exames parasitológicos das fezes de 215 cães de acordo com a idade e raça. Houve uma frequência elevada de casos entre os filhotes de raça não definida em relação aos de raça pura.

Tabela 4. Diagnóstico parasitológico em amostras de fezes de 215 cães, divididos em grupos de acordo com a raça e idade: G I (um a dois meses), G II (> dois meses a um ano) e G III (> um ano a sete anos).

Parasitos	G I		G II		G III	
	RP	SRD	RP	SRD	RP	SRD
	n = 8 n+ (%)	n = 31 n+ (%)	n = 30 n+ (%)	n = 1 n+ (%)	n = 129 n+ (%)	n = 16 n+ (%)
Ancilostomídeo	0	19 (61,3)*	0	1 (100)*	4 (3,1)*	7 (43,8)*
Ascaridídeo	0	21 (67,7)*	0	0	4 (3,1)	0
<i>Giardia</i> spp.	1 (12,5)	2 (6,5)	2 (6,7)	0	10 (7,8)	1 (6,3)
<i>Cystoisospora</i> spp.	0	7 (22,6)	0	0	0	5 (31,3)*
<i>S. stercoralis</i>	1 (12,5)*	0	0	0	1 (0,8)	0
<i>Trichuris vulpis</i>	0	0	1 (3,3)	0	0	0

RP = Raça Pura; SRD = sem raça definida; n+ = número de positivos; (%) = porcentagem de positivos. * $p < 0,05$ entre RP e SRD por grupo, do parasito.

4.2. Diagnóstico Imunológico

Os resultados imunológicos mostraram 45/215 (20,9%) cães soropositivos para anticorpos anti-*S. stercoralis*, sendo de 0% (0/39) no grupo I; 22,6% (7/31) no grupo II, e 26,2% (38/145) no grupo III.

Anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* foram detectados pelo IFAT (Figura 1) em 35 (16,3%) dos 215 cães. Nenhum animal do grupo I foi soropositivo; 4/31 (12,9%) cães do grupo II foram reativos, com títulos variando de 80 a 320; e 31/145 (21,4%) cães do grupo III mostraram reatividade, com títulos variando de 40 a 160. A soropositividade foi significativamente maior no grupo III quando comparada aos grupos I e II ($p < 0,05$).

Utilizando ELISA para a detecção de IgG anti-*S. stercoralis* (Figura 1), observou-se que 23 (10,7%) dos 215 cães foram soropositivos. Nenhum animal do grupo I apresentou reatividade, enquanto 7/31 (22,6%) cães do grupo II e 16/145 (11%) cães do grupo III foram positivos pelo ELISA. A soropositividade foi significativamente maior no grupo II comparada aos grupos I e III ($p < 0,05$).

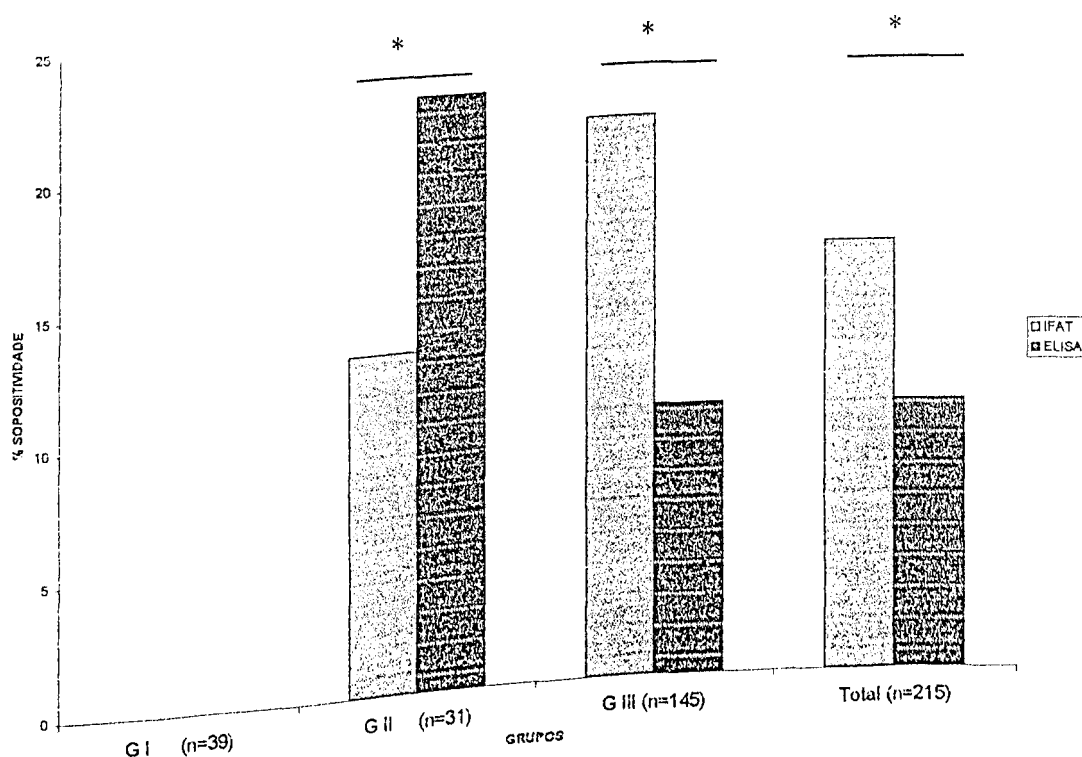


Figura 1. Soropositividade determinada por IFAT e ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* em 215 amostras de soros de cães domésticos, distribuídos de acordo com a idade nos seguintes grupos: G I (um a dois meses), G II (> dois meses a um ano) e G III (> um ano a sete anos). Significância estatística foi determinada pela análise da diferença entre duas proporções ($p < 0,05$) (*).

A figura 2 representa os níveis de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* expressos em índice ELISA (IE) para os três grupos etários. Animais do grupo III apresentaram níveis de anticorpos significativamente maiores que aqueles do grupo II e grupo I ($p < 0,05$).

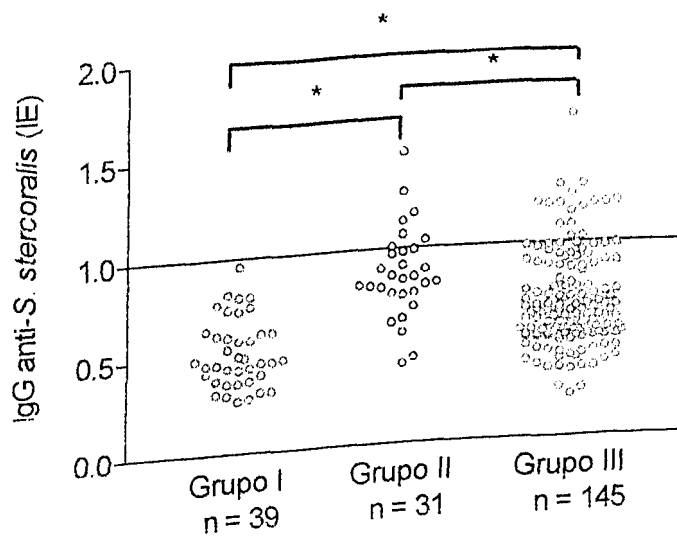


Figura 2. Níveis de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis*, expressos em Índice de reatividade ELISA (IE), determinados em 215 amostras de soros de cães domésticos, distribuídos de acordo com a idade nos seguintes grupos: G I (um a dois meses), G II (> dois meses a um ano) e G III (> um a sete anos). Valores positivos IE > 1. Significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$) (*).

Os resultados concordantes e discordantes obtidos por IFAT e ELISA estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados concordantes e discordantes obtidos por IFAT e ELISA para a detecção de IgG anti-*S. stercoralis* em amostras de soros de cães, distribuídos de acordo com a idade nos grupos: G I (1 a 2 meses), G II (> 2 meses a 1 ano) e G III (> 1 a 7 anos).

Testes	G I (n=39) n (%)	G II (n=31) n (%)	G III (n=145) n (%)	TOTAL (n=215) n (%)
IFAT ⁺ /ELISA ⁺	-	4 (12,9)	9 (6,2)	13 (6,0) ^c
IFAT ⁻ /ELISA ⁻	39 (100) ^{a,b}	24 (77,4) ^a	107 (73,8) ^b	170 (79,1) ^c
IFAT ⁺ /ELISA ⁻	-	-	22 (15,2)	22 (10,2) ^c
IFAT ⁻ /ELISA ⁺	-	3 (9,7)	7 (4,8)	10 (4,7) ^c

n+ = número de casos positivos; (%) = porcentagem de positivos.

^a p < 0,05 (G I / G II); ^b p < 0,05 (G II / G III); ^c p < 0,05 (Σ concordantes/ Σ discordantes)

No grupo I, todos os resultados foram concordantes negativos em ambos os testes. No grupo II, 90,3% de resultados concordantes (positivos e negativos) foram observados, com apenas 9,7% de resultados discordantes (IFAT-/ELISA+). No grupo III, resultados concordantes também foram encontrados na grande maioria dos casos (80%), porém 15,2% dos resultados discordantes foram atribuídos a IFAT+/ELISA- e somente 4,8% a IFAT-/ELISA+. No total, uma concordância de 183/215 (85,1%) foi verificada entre IFAT e ELISA, com 22/215 (10,2%) de resultados discordantes atribuídos a IFAT+/ELISA- e 10/215 (4,7%) atribuídos a IFAT-/ELISA+.

A Tabela 6 apresenta os resultados imunológicos concordantes e discordantes de acordo com raça e sexo.

Tabela 6. Resultados concordantes e discordantes nos testes de imunodiagnóstico IFAT e ELISA na detecção de IgG anti-*S. stercoralis* em amostras de soros de cães, de acordo com raça e sexo.

TESTES	RP		SRD	
	M n (%)	F N (%)	M n (%)	F n (%)
IFAT+/ELISA+	9 (18,4)*	4 (3,4)*	0	0
IFAT-/ELISA-	34 (69,4)	90 (76,3)	21 (95,5)	25 (96,2)
IFAT+/ELISA-	1 (2,0)*	19 (16,1)*	1 (4,5)	1 (3,8)
IFAT-/ELISA+	5 (10,2)	5 (4,2)	0	0
Total (n)	49 (100)	118 (100)	22 (100)	26 (100)

RP = Raça Pura; SRD = sem raça definida; M = macho; F = fêmea

n+ = número de positivos; (%) = porcentagem de positivos

* $p < 0,05$ entre machos e fêmeas por raça.

Nos cães SRD não houve concordantes positivos, sendo que 19,6 % dos machos e 3,3 % das fêmeas de raça pura apresentaram concordância positiva. Os discordantes foram 13 % dos machos e 19,7% das fêmeas de raça pura, nos SRD foram 4,5 % dos machos e 4 % de fêmeas.

A Tabela 7 apresenta os resultados dos testes de IFAT e ELISA para detecção de IgG anti-*S. stercoralis* de acordo com os títulos da imunofluorescência, índice ELISA, idade, raça e sexo dos cães estudados.

Tabela 7. Resultados da soropositividade nos testes IFAT e ELISA em 215 amostras de soros de cães de acordo com a idade (G I (um a dois meses), G II (> dois meses a um ano) e G III (> um ano a sete anos), raça e sexo.

Testes	Título	G I n = 39				G II n = 31				G III n = 145			
		RP n + / %		SRD n + / %		RP n + / %		SRD n + / %		RP n + / %		SRD n + / %	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
IFAT	< 40	3/7,7	5/12,8	16/41	15/38,5	8/25,8	18/58,1	0	1/3,2	28/19,2	72/49,7	5/3,4	9/
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	2/1,4	0	0	0
	80	0	0	0	0	2/6,5	0	0	0	4/2,8	18/12,4	1/0,7	0
	160	0	0	0	0	0	1/3,2	0	0	1/0,7	4/2,8	0	1/0
	320	0	0	0	0	1/3,2	0	0	0	0	0	0	0
ELISA	IE	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
	< 1	3/7,7	5/12,8	16/41	15/38,5	7/22,6	16/51,6	0	1/3,2	25/17,2	88/60,8	6/4,1	10/6,
> 1	0	0	0	0	4/12,9	3/9,7	0	0	10/6,9	6/4,1	0	0	

RP = Raça Pura; SRD = sem raça definida; M = macho; F = fêmea.

n+ = número de positivos; (%) = porcentagem de positivos; IE = Índice ELISA.

O cão eliminando larvas de *S. stercoralis* do Grupo I (macho, 60 dias de idade, raça Shitzu, procedente de Araxá) não apresentou sorologia positiva. O segundo caso parasitologicamente positivo (macho, dois anos de idade, Pit Bull, procedente de

Uberlândia) foi reagente no título de 40, na reação de imunofluorescência e apresentou índice de reatividade 1,66 no teste ELISA. Ambos os casos apresentavam-se monoparasitados.

A Tabela 8 apresenta a comparação dos resultados parasitológicos e imunológicos (IFAT e ELISA) nos cães com coproparasitológico positivo.

Tabela 8. Resultados comparativos entre os testes parasitológicos e imunológicos (IFAT e ELISA) para detecção de estrogiloidiase nos cães com diagnóstico coproparasitológico positivo.

Parasitos	IFAT	ELISA
	n (%)	n (%)
Ancilostomídeo (n=31)	1 (3,2)	0
Ascaridídeo (n=25)	0	0
<i>Giardia</i> spp. (n=16)	4 (25)	1 (6,3)
<i>Cystoisospora</i> spp. (n=12)	1 (8,3)	0
<i>S. stercoralis</i> (n=2)	1 (50)	1 (50)
<i>Trichuris vulpis</i> (n=1)	0	0

Não houve reação cruzada no imunodiagnóstico entre *S. stercoralis*, ancilostomídeos e ascaridídeos, com exceção de um caso (fêmea, três anos, SRD) de biparasitismo por ancilostomídeo e *Cystoisospora* spp., soropositivo no IFAT com título de 160. Houve quatro casos diagnosticados de *Giardia* spp., soropositivos para *S. stercoralis* no IFAT com

título de 80, sendo um também soro-reagente no ELISA com índice de reatividade 1,16 (macho, dois anos, Shitzu). Os outros também eram adultos, sendo uma fêmea, Maltês, dois anos de idade; uma fêmea, Sharpei, três anos, e uma fêmea, Shitzu, quatro anos.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, do total de resultados positivos nas análises coproparasitológicas, a maior porcentagem de animais parasitados foi detectada entre os cães de um a dois meses de idade, sendo que os ancilostomídeos e os ascaridídeos foram os parasitos mais diagnosticados, e uma alta positividade também foi verificada nos cães adultos de uma sete anos de idade, havendo concordância dos resultados encontrados, nos filhotes, com a literatura consultada (ARAUJO et al., 1986; OLIVEIRA et al., 1990; GENNARI et al., 1999; MUNDIM; CABRAL; FARIA, 2001; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002; BLAZIUS et al., 2005).

As vias de transmissão transplacentária e transmamária contribuíram para alta porcentagem de infecção, por ancilostomídeos e ascaridídeos, entre os filhotes de um a dois meses de idade, enquanto que as condições inadequadas de higiene, de controle parasitário e de nutrição, explicam a maior porcentagem de parasitoses entre os cães SRD, em comparação com os cães RP, independentemente da idade dos animais avaliados.

T. vulpis foi pouco diagnosticado em comparação a ancilostomídeos e ascaridídeos, ainda que as condições necessárias ao ciclo de vida das geohelmintoses existissem, o que leva a crer que esse parasito é de baixa ocorrência entre os cães das localidades avaliadas.

Nesse estudo *Giardia* spp. e *Cystosporospora* spp. apresentaram número de ocorrências crescente em relação à idade dos cães, semelhante ao que relata OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2004, a justificativa para este fato são as condições inadequadas de manejo sanitário nos canis.

O diagnóstico pioneiro, através de métodos coproparasitológico, de *S. stercoralis* em cães procedentes de Araxá e Uberlândia, apresentou baixa porcentagem de animais positivos não confirmando a suspeita de que ela teria valores mais elevados daqueles

encontrados na literatura sobre estrogiloidíase canina, porque a região de Uberlândia é considerada hiperendêmica para a estrogiloidíase humana (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998; TRAUB, et al., 2002; ITOH et al., 2003; ASANO et al., ASANO et al., 2004).

A porcentagem de cães infectados por *S. stercoralis*, diagnosticada pelos métodos coproparasitológicos, foi baixa em comparação com a porcentagem dos ancilostomídeos, sendo diferente de MORAES (1948), que verificou uma correlação direta entre a ocorrência das duas parasitoses na estrogiloidíase humana devido às semelhanças epidemiológicas existentes entre as duas helmintíases. Entretanto os resultados do presente estudo estão de acordo com a literatura consultada para a estrogiloidíase canina, que demonstra uma maior frequência de ancilostomídeos em comparação a *S. stercoralis* (CARNEIRO et al., 1973; COSTA et al., 1990; ITOH et al., 2003).

A auto-cura que ocorre em dois terços dos cães infectados por *S. stercoralis*, o curto período de eliminação de L1 nas fezes (GROVE; NORTHERN, 1982), a ausência de transmissão transplacentária (SHOOP et al., 2004), a ausência de portadores caninos ou humanos eliminando L1 nas fezes contaminando o ambiente, e portanto favorecendo a infecção entre ambos hospedeiros (HENDRIX; BLAGBURN; LINDSAY, 1987) podem justificar a baixa incidência da estrogiloidíase entre os cães analisados pelos métodos coproparasitológicos no presente estudo.

Nesse estudo, na maior parte das análises fecais, sob circunstâncias higiênicas que favorecem todas as geo-helmintoses, somente os ancilostomídeos e os ascaridídeos foram diagnosticados. Os cães que desenvolvem a estrogiloidíase crônica (1/3 dos infectados) podem ter apresentado resultados coproparasitológicos falso negativos, devido a reduzida eliminação das larvas nas fezes e a baixa sensibilidade dos testes coprológicos, estando de acordo com os resultados de GROVE (1996).

Segundo SOULSBY (1982) as espécies *S. papillosus*, *S. ransoni*, *S. westeri* possuem via de transmissão transmamária, a existência desta via em *S. stercoralis* somente pôde ser demonstrada quando a infecção da cadela ocorre até três dias após o parto (SHOOP et al., 2004), quais podem ser os mecanismos reguladores que impedem *S. stercoralis* de migrar para a glândula mamária ou para o útero das cadelas, antes do parto, livrando os filhotes de nascerem parasitados ou infectarem-se logo em seguida à primeira mamada, tal como ocorre com os ancilostomídeos e os ascaridídeos? A migração de L3 para o útero ou glândula mamária, poderia ocorrer nos casos de imunossupressão grave da fêmea gestante, desencadeando a hiperinfecção à partir de uma infecção crônica ou de reativação de larvas em estado de hipobiose nos tecidos da cadela, com evolução para a disseminação?

Devido ao número muito reduzido de cães positivos, nos testes coproparasitológicos para *S. stercoralis*, a ocorrência de diferença estatística significativa entre os machos e as fêmeas, não permite inferir que os cães do sexo masculino são mais susceptíveis a *S. stercoralis* do que as cadelas, exceto quando estes cães machos estiverem expostos a situações com risco maior de infecção.

Os dados de HENDRIX; BLAGBURN; LINDSAY (1987) que citam a strongiloidíase canina como um problema, parasitológico, para canis dos Estados Unidos da América, não foram confirmados pelos resultados coprológicos deste estudo em canis de Araxá, Campo Belo e Uberlândia. *S. stercoralis* apresentou porcentagem baixa de ocorrência entre os cães, entretanto se o problema está relacionado às perdas econômicas com o tratamento, e às vezes o óbito dos animais infectados, então também pode-se considerar esse helminto como um problema para os canis do Brasil (FERREIRA JUNIOR et al., 2004).

Os métodos imunológicos são úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro nos casos de formas assintomáticas e no esclarecimento do diagnóstico clínico, além da possibilidade de emprego em inquéritos soropidemiológicos (COSTA-CRUZ, 2000).

Os resultados coproparasitológicos, do presente estudo, quando comparados àqueles da detecção de anticorpos IgG específicos anti-*S. stercoralis*, utilizando o teste IFAT e o ELISA, estão de acordo com SIDDIQUI e BERK (2001) que citam os métodos coproparasitológicos por subestimarem a incidência da estrogiloidíase canina e, apesar dos testes de IFAT e ELISA superestimarem a ocorrência da parasitose, eles apontam os indivíduos que necessitam de mais investigação para detectar a presença do parasito no hospedeiro.

A utilização de testes para imunodiagnóstico com princípios diferentes (IFAT-antígenos cuticulares; ELISA – antígenos solúveis), não detectaram anticorpos específicos para *S. stercoralis*, nos cães de um a dois meses de idade, e também não ocorreu reatividade cruzada com os outros helmintos diagnosticados nesse grupo de animais.

Segundo TIZARD (2002), a falha na transferência da imunidade passiva, para os filhotes, pelas vias transplacentária e transmamária; a ocorrência infecção helmíntica recente sem níveis detectáveis de IgG específica sérica no momento da colheita de sangue; a ausência de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* decorrentes de infecção pregressa; a má nutrição com hipoproteinemia e imunossupressão nos filhotes; e características genéticas individuais podem ser algumas das explicações para os resultados negativos encontrados nesses cães desse grupo.

De acordo com os resultados dos testes IFAT e ELISA, no presente estudo, as fêmeas são mais susceptíveis à estrogiloidíase do que os machos. No ciclo de vida de *S. stercoralis*, epidemiologicamente, no período de parto e lactação as cadelas são alojadas,

junto com os filhotes, em áreas de maternidade as quais se não forem mantidas em condições adequadas de higiene visando a remoção das fezes, expõe os animais ao risco de infecção por enteroparasitos como *S. stercoralis*.

Nesse estudo os resultados dos testes imunológicos utilizados na detecção de anticorpos específicos anti-*S. stercoralis*, demonstram infecção pregressa dos cães de raça pura, procedentes de canis, isso porque é longo o tempo de permanência desses animais nos canis, principalmente os adultos, aumentando o risco de infecção.

Os ancilostomídeos e os ascaridídeos apresentam reação cruzada na detecção de anticorpos específicos anti-*S. stercoralis*, devido à similaridade entre algumas proteínas de cutícula desses helmintos (SIDDIQUI; BERK, 2001), entretanto os cães positivos nos testes coproparasitológicos para os dois primeiros parasitos foram negativos nos testes IFAT e ELISA.

No IFAT para estrogiloidíase canina, a utilização de Azul de Evans, como contraste de coloração, na concentração ideal de 3%, foi idêntica a usada no protocolo da estrogiloidíase humana (MACHADO et al., 2001), e superior àquela de uso em IFAT para detecção de anticorpos em outras doenças parasitárias (1:22.000 para o protozoário *Trypanosoma cruzi*) em amostras de soros de cães (LAURICELLA et al., 1998), permitiu uma correta discriminação das reações positivas para a detecção de anticorpos IgG específico anti-*S. stercoralis*.

O extrato salino de *S. stercoralis* produzido para o teste ELISA, apresenta maior concentração de antígenos de secreção e de excreção, porque o protocolo de produção não visa a extração de grandes quantidades de antígenos da superfície cuticular do helminto (RODRIGUES et al., 2004). A concentração protéica ideal, de 5 µg/mL, utilizada para o

antígeno de *S. stercoralis*, mais a diluição ideal de 1:100 para os soros dos cães, mais o título ideal de 200 para o conjugado, associados ao bloqueio da placa de poliestireno com leite desnatado 5%, reduziram as reações inespecíficas no teste imunoenzimático.

Nesse estudo os altos índices de concordância positiva e negativa, entre os testes IFAT e ELISA, para a detecção de anticorpos específicos na estrogiloidíase canina, demonstraram a capacidade de discriminar, entre os cães, aqueles que apresentavam IgG anti-*S. stercoralis* nas amostras de soro analisadas. Apesar da detecção dos anticorpos, esses testes não distinguem entre infecção passada e presente.

6. CONCLUSÕES

Foi realizada a identificação pioneira de larvas de *S. stercoralis* em fezes de cães de Uberlândia e Araxá, utilizando os métodos coproparasitológicos. A incidência da estrongiloidíase em cães é muito menor do que a da doença humana nas localidades analisadas.

Ancilostomídeos, ascaridídeos e *Giardia* spp., continuam sendo enteroparasitos zoonóticos frequentes entre os cães.

Anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* foram detectados, pela primeira vez, em amostras de soros de cães domésticos, utilizando o teste IFAT em lâmina com antígeno homólogo particulado e ELISA com extrato salino homólogo.

O testes IFAT, em comparação com o ELISA, apresentou os melhores resultados, na detecção de anticorpos específicos, estando indicada para auxiliar o diagnóstico da estrongiloidíase canina.

7. RESUMO

A estrogiloidíase canina é uma parasitose de potencial zoonótico, causada pelo helminto *Strongyloides stercoralis*. Uma vez que o diagnóstico por métodos coproparasitológicos é difícil, a detecção de anticorpos específicos no soro pode contribuir auxiliando o diagnóstico. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *S. stercoralis* pelos métodos coproparasitológicos e detectar anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* em amostras de soro de cães domésticos, utilizando os testes de imunofluorescência indireta (IFAT) em lâmina e *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Analisaram-se 215 cães, procedentes de Uberlândia, Araxá e Campo Belo, Minas Gerais, de várias raças, distribuídos de acordo com a idade nos seguintes grupos: (I) 19 machos e 20 fêmeas, de um a dois meses de idade; (II) 11 machos e 20 fêmeas, acima de dois meses a um ano; (III) 41 machos e 104 fêmeas, com mais de um ano a sete anos. Os resultados coproparasitológicos evidenciaram 63/215 (29,3%) cães com algum tipo de parasito, sendo que dois (0,9%) cães (um procedente de Araxá e o outro procedente de Uberlândia) apresentaram larvas de *S. stercoralis* nas fezes. Os resultados imunológicos mostraram 45/215 (20,9%) cães soropositivos, sendo de 0% (0/39) no grupo I, 22,6% (7/31) no grupo II, e 26,2% (38/145) no grupo III. Não houve reação cruzada nos resultados dos testes imunológicos para *S. stercoralis* entre ancilostomídeos e ascaridídeos, exceto por um caso de biparasitismo por ancilostomídeo e *Cystoisospora* spp., positivo somente no IFAT. O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, a infecção natural de *S. stercoralis* em cães, que foi diagnosticada por métodos coprológicos e imunológicos. Assim, a detecção de anticorpos específicos para *S. stercoralis*, pelos testes IFAT e ELISA, podem contribuir no diagnóstico da estrogiloidíase canina.

Palavras chave: Enteroparasitos, *Strongyloides stercoralis*, cão, coproparasitológico, imunodiagnóstico.

8. ABSTRACT

Canine strongyloidiasis is a parasitic infection caused by the nematode *Strongyloides stercoralis* and presents a great zoonotic potential. As its confirmation by using coproparasitological methods is not easy, the detection of serum specific antibodies could contribute to the diagnosis. The aim of this study was to investigate the presence of *S. stercoralis* by parasitological methods and to detect specific antibodies to the parasite in serum samples from domestic dogs by using the indirect fluorescent antibody test (IFAT) in slides and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A total of 215 dogs of various breeds, coming from Uberlândia, Araxá and Campo Belo, state of Minas Gerais, were studied and distributed according to age in the following groups: (I) 19 male and 20 female dogs, with 1 to 2 months old; (II) 11 male and 20 female dogs, from 2 months to 1 year old; (III) 41 male and 104 female dogs, from 1 to 7 years old. Coproparasitological results showed that 63/215 (29.3%) dogs presented some kind of parasite, with 2 (0.9%) dogs (one from Araxá and another from Uberlândia) exhibiting *S. stercoralis* larvae in feces. Serological results revealed antibodies to *S. stercoralis* in 45/215 (20.9%) dogs, with seropositivity rates of 0% (0/39) in group I, 22.6% (7/31) in group II, and 26.2% (38/145) in group III. No serological cross-reactivity between *S. stercoralis* and hookworms or Ascaridae was found. Only one dog with biparasitism (hookworm and *Cystoisospora* spp) was also *S. stercoralis* seropositive in IFAT. The present study demonstrated for the first time the natural *S. stercoralis* infection in dogs that was diagnosed by coproparasitological and serological methods. Also, the detection of specific antibodies to *S. stercoralis* by IFAT and ELISA could contribute to the diagnosis of canine strongyloidiasis.

Key words: *Strongyloides stercoralis*, enteroparasites, dogs, parasitological diagnosis, immunodiagnosis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ARAUJO, R.B.; FERREIRA, P.M.; ASSIS, C.B.; DEL CARLO, R.J.; VIEIRA, D. Helminthoses intestinais em cães da microrregião de Viçosa – Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.38, n.2, p. 197-203, 1986.

ASANO, K.; SUZUKI, K.; MATSUMOTO, T.; SAKAI, T.; ASANO, R. Prevalence of dogs with intestinal parasites in Tochigi, Japan in 1979, 1991 and 2002. **Veterinary Parasitology**, v 120, p.243-248, 2004.

ASHTON, F.T.; LI, J.; SCHAD, G.A. Chemo and thermosensory neurons: structure and function in animal parasitic nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.297-316, 1999.

ASHTON, F.T.; BHOPALE, V.M.; FINE, A.E.; SCHAD, G.A. Sensory neuroanatomy of a skin penetrating nematode parasite: *Strongyloides stercoralis*. I Amphidial Neurons. **The Journal of Comparative Neurology**, v.357, p.281-295, 1995.

BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematoden) Larven in Erdpnoen. Mededeel. mit. H. Geneesk. Batavia, **Laboratories Weltevreden Feestbundel**. p41-47, 1917.

¹ Referências de acordo com a NBR-6023/2002 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, Comissão de Estudos de Documentação, Rio de Janeiro.

BARUTZKI, D.; SCHAPER, R. Endoparasites in dogs and cats in Germany. **Parasitology Research**, v.90, n.3, p.148-150, 2003.

BLAZIUS, R.D.; EMERICK, S.; PROPHIRO, J.S.; ROMÃO, P.R.T.; SILVA, O S.
Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães errantes da cidade de Itapema, Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p.73-74, 2005.

BUGG, R.J.; ROBERTSON, I.D.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R.C. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. **Veterinary Journal**, v.157, n.3, p.295-301, 1999.

BURKE, T.M.; ROBERSON. E.L. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: experimental infection of bitch at midpregnancy and at parturition. **International Journal for Parasitology**, v.15, n.5, p.485-490, 1985.

CANÇADO, J. R. Estudo sobre a frequência dos parasitos intestinais humanos. **Brasil Médico**, v.54, p.551-558, 1940.

CARNEIRO, J.R.; FREITAS, J.S.; PEREIRA,E.; CAMPOS, D.M.B.; JARDIM, S.V.
Prevalência de helmintos em "Canis familiaris" no município de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v.4, n.2, p. 401-404, 1973.

CIOMS. **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**, Genebra, 1985. URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts-of_guidelines.htm. Acessado em 2003 Jul 30.

CONWAY, D.J.; ATKINS, N.S.; LILLYWHITE, J.E.; BAILEY, J.W.; ROBINSON, R.D.; LINDO, J.F.; BUNDY, D.A.P.; BIANCO, A.E. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect-ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.87, p.173-176, 1993.

COSTA, J.O.; GUIMARÃES, M.P.; LIMA, W.S.; LIMA, E.A.M. Endo and ectoparasites of dogs from Vitoria county – Espirito Santo- Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina e Zootecnia**, v.42, n.5, p. 451-452, 1990.

COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis* In: NEVES, D.P.; de MELO, A.L.; GENARO, O .; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**, 10^a ed., Atheneu, p.247-258, 2000.

COSTA-CRUZ, J.M., BULLAMAH, C.B., GONÇALVES-PIRES, M.R.F., CAMPOS, D.M.B.; VIEIRA, M.A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, p.313-317, 1997.

DAWKINS H.J.; GROVE, D.I. Attempts to establish infections with *Strongyloides stercoralis* in mice and other laboratory animals. **Journal of Helminthology**, v.56, n. 1, p. 23-26, 1982.

EGUIA-AGUILLAR P.; CRUZ-REYES, A; MARTINES-MAYÁ, J.J. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico city. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.2, p.139-146, 2005.

EPE, C.; COATI, N.; SCHNIEDER T. Results of parasitological examinations of faecal samples from horse, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 e 2002. **Deutsch Tierarztl Wochenschr**, v.111, n.6, p.243-247, 2004.

FARIA, J. GOMES DE. Estudo estatístico sobre a frequência de parasitos intestinais nas crianças do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.3, n.2, p.228-335, 1911.

FERREIRA, M.S. Strongyloidiasis and acquired immunodeficiency syndrome. **Enfermedades Emergentes**, v.5, p.18-26, 2003.

FERREIRA JUNIOR, A.; CABRAL, D.D.; MUNDIM, E.D.; SILINGARDI, P.G.T.; SANTOS, J.P; SILVA, T.K.; COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis* (BAVAY, 1866) Primeiro caso relatado de infecção natural maciça, em filhotes de cão doméstico (*Canis familiaris*, LINNAEUS-1758) no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p. 265, 2004.

FOK, E; SZATMARI, V.; BUSAK, K.; ROZGONYI F. Prevalence of intestinal parasites in dogs in some urban and rural areas of Hungary. **Veterinary Quaterly**, v.23, n.2, p.96-98, 2001.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3^a ed. Ícone. São Paulo, 686 p., 1997.

FREITAS, M.F. **Helmintologia Veterinária**. Copiadora e Editora Rabelo & Brasil. Belo Horizonte, p.396, 1976.

FRÓES, H.P. Identification of nematode larvae in the exudate of a sero-hemorrhagic pleural effusion. **Journal of Tropical Hygiene**, v.33, p.18-19, 1930.

FÜELLEBORN, F. Untersuchungen ueber den Infektionsweg bei *Strongyloides* und *Ankylostomum* und die Biologie dieser Parasiten. **Arch. F. Schiffs-u. Tropen Hyg., Beih.**, v.5, p.26-80, 1914.

GAM, A.A.; NEVA, F.A.; KROTOSKI, W.A. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.37, p.157-161, 1987.

GENNARI, S.M.; KASAI, N.; PENA, H.F.J.; CORTEZ, A. Occurrence of protozoa and helminths in faecal samples of dogs and cats from São Paulo city. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, 1999. <http://www.scielo.com.br> acessado em 30/04/2005.

GENTA, R.M. *Strongyloides stercoralis*: immunobiological considerations on an unusual worm. **Parasitology Today**, v.2, p. 241-246, 1986.

GENTA, R.M.; SCHAD, G.A.; HELMMAN, M.E. *Strongyloides stercoralis*: parasitological, immunological and pathological observations in immunosuppressed dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, n. 1, p. 34-41, 1986.

GEORGI, J.R.; SPRINKLE, C.L. A case of human strongyloidosis apparently contracted from asymptomatic colony dogs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.23, n.5, p. 899-901, 1974.

GRANDJEAN, D.; VAISSAIRE, J.; VAISSAIRE, J.P. **Enciclopédia do Cão**. Aniwa Publishing, Paris, 635 p., 2001.

GRASSI, B.; PARONA, C.; PARONA, E. Sovra l'anguillula intestinale (dell'omo) e sovra embrioni probabilmente d'anguillula intestinale. **Archive per le Ac. Med. Torino**, v. 3, n.10, p. 1-14, 1879.

- GROVE, D.I. Human strongyloidiasis. In: **Advances in Parasitology**, New York: Academic Press. v.38, p.251-309, 1996.
- GROVE, D.I., NORTHERN, C. Infection and immunity in dogs infected with a human strain of *Strongyloides stercoralis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, p.833-838, 1982.
- GROVE, D.I.; HEENAN, P.J.; NORTHERN, C. Persistent and disseminated infections with *Strongyloides stercoralis* in immunosuppressed dogs. **International Journal of Parasitology**, v.13, p.483-490, 1983.
- GUIMARÃES JUNIOR, J.S.; VIDOTTO, O; YAMAMURA, M.H.; FONSECA, N.A.N.; ROSS, G.M.; PEREIRA, A.B.L. Helminthoses gastrintestinais em cães (*Canis familiaris*) na região de Londrina-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v.17, n.1, p.29-32, 1996.
- HACKETT, T.; LAPPIN, MR. Prevalence of enteric pathogens in dogs of north-central Colorado. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.39, n.1, p.52-56, 2003.
- HENDRIX, C.M.; BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S. Whipworms and intestinal threadworms. **The Veterinary Clinics of North America**, v.17, n.6, p. 1366-1373, 1987.
- HOTEZ, P.; HAGGERTY, J.; HAWDON, J.; MILSTONE, L.; GAMBLE, H.R.; SCHAD, G.A.; RICHARD, F. Metalloproteases of infective *Ancylostoma* hookworm larvae and their

possible function in tissue invasion and ecdysis. **Infection and Immunity**, v.58, n.12, p.3883-3892, 1990.

ITO, N.; MURAOKA, N.; AOKI, M.; ITAGAKI, T. Prevalence of *Strongyloides* spp. infection in household dogs. **Kansenshogaku Zasshi**, v.77, p.430-435, 2003.

JORDAN, H.E.; MULLINS, S.T.; STEBBINS, M.E. Endoparasitism in dogs: 21.583 cases (1981-1990). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.203, n.4, p.547-549, 1993.

KOOSHA, S.; FESHARAKI, M.; ROKNI, M.B. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **The Pakistan of Journal Medicine and Science**, v.20, n.1, p.36-40, 2004.

LAURICELLA, M.A.; CASTAÑERA M.B.; GÜRTHER, R.E.; SEGURA, E.L. Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chaga's Disease) infection in naturally infected dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.4, p.501-507, 1998.

LE NOBEL, W.E.; ROBBEN S.R.; DOPFER, D.; HENDRIKX W.M.; BOERSEMA, J.H.; FRANSEN F.; EYSKER, M. Infections with endoparasites in dogs in Dutch animals shelters. **Tijdschr Diergeneeskd**, v.129, n.2, p.40-44, 2004.

LEUCKART, R. Ueber die Lebensgeschichte der sogenannten *A.stercoralis* und deren Besienhungen zu der sog *A. intestinalis*. **Ber. Ueber d. Verhand d. Kaiserl. Saechs. Gesellschaft zu Leipssig., Math. Phys. Klasse.**, n.34, p.85-107, 1882.

LINDO, F.J.; CONWAY, D.J.; ATKINS, N.S.; BIANCO, A.E.; ROBINON, R.D.; BUNDY, D.A.P. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.51, n.2, p.175-179, 1994.

LOPES, M.P.; NOLAN, T.; SCHAD, G.A. Growth of the genital primordium as a marker to describe a time course for the heterogenic larval development in *Strongyloides stercoralis*. **The Journal of Parasitology**, v.86, p. 882-883, 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemical**, v.29, p.265-275, 1951.

LUTZ, A. Ueber eine *Rhabdonema* – Art de Schweines, sawie ueber den Befund der *Rhabdonema strongyloides* (*Anguillula instestinalis* und *stercoralis*) beim Menschen. **Centralb. Klin. Med.**, v.6, n.23, p. 385-390, 1885.

LUTZ, A.V. *Schistosoma mansoni* e a schitosomose, segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.11, p.121-125, 1919.

- MACHADO, E.R.; COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.161-164, 1998.
- MACHADO, E.R.; UETA, M.T.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; OLIVEIRA, J.B.A.; FACCIOLI, L.H.; COSTA-CRUZ, J.M. Diagnosis of Human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v.99, p.52-55, 2001.
- MALONE, J.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; LITTLE, M.D.; OCHOA, R.; WOLF, K.A. *Strongyloides stercoralis*-like infection in a dog. **The Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.176, p.130-133, 1980.
- MANSFIELD, L.S.; SCHAD, G.A. *Strongyloides stercoralis* infection in IgA-deficient dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.47, p.830-836, 1992.
- MANSFIELD, L.S.; ALAVI, A.; WORTMAN, J.A.; SCHAD, G.A. Gamma camera scintigraphy for direct visualization of larval migration in *Strongyloides stercoralis*-infected dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, p.236-240, 1995.
- MARTINI, W. Tubagem duodenal. (*Strongyloides*). **Revista Fluminense de Medicina**, v.3, n.6, p. 267-288, 1938.

McKERROW, J.H.; BRINDLEY, P.; BROWN, M.; GAM, A.A.; STAUNTON, C.; NEVA, F.A. *Strongyloides stercoralis* identification of a protease that facilitates penetration of skin by infective larvae. **Experimental Parasitology**, n.70, p.134-143, 1990.

MINAAR, W.N.; KRECEK, R.C. Helminths in dogs belonging to people in a resource-limited urban community in Gauteng, South Africa. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.68, n.2, p.111-117, 2001.

MINAAR, W.N.; KRECEK R.C.; FOURIE, L.J. Helminths in dog from a peri-urban resource-limited community in Free State Province, South Africa. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.4, p.343-349, 2002.

MORAES, R.G. Contribuição para o estudo de *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v.1, p.507-524, 1948.

MUNDIM, M.J.S.; CABRAL, D.D.; FARIA, E.S.M. Endoparasites of importance as zoonosis found in faecal samples from domiciliated dogs in Uberlândia, Minas Gerais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.7, n.2, p. 73-77, 2001.

OLIVEIRA, P.R.; SILVA, P.L.; PARREIRA, V.F.; RIBEIRO, S.C.A.; GOMES, J.B. Prevalence of endoparasites in dogs in the region of Uberlândia, Minas Gerais State. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.27, n.2, p.193-197, 1990.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T.; FERRARI, T.B.; NUNES, L.C.
Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary
Parasitology**, v.103, p.19-27, 2002.

RAMIRAZ-BARRIOS, R.A.; BARBOSA-MENA, G.; MUNOZ J.; ANGULO-CUBILLAN
F.; HERNANDEZ E.; GANZALES, F.; ESCALONA, F. Prevalence of intestinal parasites
in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. **Veterinary Parasitology**, v.121,
n.1-2, p.11-20, 2004.

RENAULT, L.; VERSIANI, W. Parasitismo humano por helmintos e protozoários em Belo
Horizonte. **Brasil Médico**, v.54, p.487, 1940.

RIBEIRO DA LUZ, A. C. Investigações helmintológicas com aplicação à patologia
brasileira. 1° _ Nota sobre a diarreia endêmica dos países quentes e sua origem parasitária: a
Anguillula stercoral no Brasil. 2° _ Contribuição ao estudo do *Dochmius duodenalis*, e dos
efeitos de sua presença no intestino humano. Rio de Janeiro. **Archivos Medicina Naval**,
v.34, p. 462-468, 1880.

ROBERTSON, I.D.; THOMPSON, R.C. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs
and cats. **Microbes and Infection**, v.4, p.867-873, 2002.

- ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v.30, n.12-13, p. 1369-1377, 2000.
- RODRIGUES, P.C. **Bioestatística**. Niterói: EDUFF, 227p., 1986.
- RODRIGUES, R.M.; SOPELETE, M.C.; SILVA, D.A.O.; CUNHA-JUNIOR, J.P.; TAKETOMI, E.A.; COSTA_CRUZ, J.M. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.83-89, 2004.
- SANCHEZ THEVENET, P.; JENSEN, O; MELLADO, I.; TORRECILLAS, C.; RASO, S.; FLORES, M.E.; MINVIELLE, M.C.; BASUALDO, J.A. Presence and persistence of intestinal parasites in canine fecal material collected from the environment in the province of Chubut, Argentine Patagonia. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.4, p.263-269, 2003.
- SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.37, p.35-41, 1995.
- SCHAD, G.A; HELLMAN, M.E; MUNCEY, D.W. *Strongyloides stercoralis*: hyperinfection in immunosuppressed dogs. **Experimental Parasitology**, v.57, p.287-296, 1984.

SENRA, J.; FELICISSIMO, O. Contribuição ao estudo das parasitoses humanas em Belo Horizonte. **Brasil Médico**, v.56, p.547-549, 1942.

SHIWAKU, K.; CHIGUSA, Y.; KADOSAKA, T.; KANEKO, K. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology**, v.97, p.129-138, 1988.

SHOOP, W.L.; MICHAEL, B.F.; EARY, C.H.; HAINES, H.W. Transmammary transmission of *Strongyloides stercoralis* in dogs. **Journal of Parasitology**, v.88, n.3, p.536-539, 2002.

SIDDIQUI, A.A.; BERK, S.L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Travel Medicine**, v.33, p.1040-1047, 2001.

SILVA, L.P.; BARCELOS, I.S.C.; PASSOS-LIMA, A.B.; ESPINDOLA, F.S.; CAMPOS, D.M.B.; COSTA-CRUZ, J.M. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.687-691, 2003.

SOULSBY, E.J. **Helminths, Artropods and Protozoa of Domesticated Animals**. Bailliére Tindall. London, 809p., 1982.

STILES, C.W.; HASSAL, A. *S. stercoralis*, the correct name of the Cochin China Diarrhea. **American Medicine**, v.4, n.9, p.343, 1902.

STROMBECK, D.R.; GUILFORD, W.G. **Enfermedades digestivas de los animales pequeños**. 2ª ed. Inter-médica. Colômbia, 796p., 1995.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6ª edição. ROCA, São Paulo, 530 p., 2002.

TORRES, O. Contribuição ao estudo das verminoses intestinais na Bahia. **Brasil Médico**, v. 31, p.383-396, 1917.

TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R.C.A. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea-growing community in Northeastern India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.67, p.539-545, 2002.

VISCO, R.J.; CORWIN, R.M.; SELBY, L.A. Effect of age and sex on the prevalence of intestinal parasitism in dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Associations**, v.170, n.8, p.835-837, 1977.

FU00034910-4

WILSON, M.B.; NAKANE, P.K. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In **W. Knapp, K. Holubán, G. Wick (eds.): Immunofluorescence and Related Techniques**. North-Holland Biomedical, Amsterdam, p. 215, 1978.