

FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxocara* EM FRANGOS CRIADOS EM SISTEMA SEMI-INTENSIVO, NO NORTE DO PARANÁ, SUL DO BRASIL

ADILSON CARDOSO DE OLIVEIRA

FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxocara* EM FRANGOS CRIADOS EM SISTEMA SEMI-INTENSIVO, NO NORTE DO PARANÁ, SUL DO BRASIL

ADILSON CARDOSO DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:
Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém.

636.50896959 Oliveira, Adilson Cardoso de.
O48f Frequência de anticorpos anti-*Toxocara* em frangos criados em sistema semi-intensivo, no Norte do Paraná, Sul do Brasil/ Adilson Cardoso de Oliveira – Presidente Prudente, 2017.
51 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Vamilton Alvares Santarém.

1. Toxocaríase. 2. Larva migrans. 3.
Zoonoses I. Título.

ADILSON CARDOSO DE OLIVEIRA

FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxocara* EM FRANGOS CRIADOS EM SISTEMA SEMI-INTENSIVO, NO NORTE DO PARANÁ, SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 14 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Rogério Giuffrida
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Willian Marinho Dourado Coelho
Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina – FCAA
Andradina – SP

DEDICATÓRIA

Ao Ser Supremo, pela vida e a possibilidade de empreender esse caminho evolutivo, por propiciar tantas oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

A MINHA FAMÍLIA, especialmente à minha esposa Rosilaine e incondicional companheira e aos meus filhos Nicolas e Victor que, mesmo estando a alguns quilômetros de distância, se mantiveram incansáveis em suas manifestações de apoio e carinho.

A MINHA MÃE Lourdes e MEU PAI Acacio (In memorian).

AGRADECIMENTOS

AOS AMIGOS de Mestrado que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado.

AO MEU ORIENTADOR Vamilton Santarém, um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência, compreensão e competência.

AOS PROFESSORES do Mestrado em Ciência Animal, agradeço o incentivo e aprendizado proporcionado. Em especial ao professor Dr. Rogério Giuffrida, por suas contribuições neste trabalho e ensinamentos em estatística. À professora Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira, pelas propostas e sugestões para este trabalho na banca de qualificação.

A TODOS OS PARTICIPANTES desse estudo, criadores de aves, colaboradores pela disposição em ajudar no que deles dependesse para a conclusão da pesquisa, embora, muitas vezes se encontrassem assoberbados pelo trabalho a realizar ou mesmo atravessando momentos de profunda dificuldade.

AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA UNOESTE e a todos os professores que fizeram parte desse caminhar. Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

A TODOS, meus sinceros agradecimentos.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando a beira-mar, divertindo-se em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

(Isaac Newton)

RESUMO

Frequência de anticorpos anti-*Toxocara* em frangos criados em sistema semi-intensivo, no Norte do Paraná, Sul do Brasil

Toxocaríase é uma importante zoonose, com ampla distribuição mundial. A principal via de transmissão da doença para humanos se deve à ingestão acidental de ovos de *Toxocara* spp. presentes NO solo. Estudos têm descrito a infecção de seres humanos pelo consumo de carne crua ou mal cozida de frango. Os frangos criados em sistema semi-intensivo têm sido também considerados como sentinelas para a contaminação de solo por ovos de *Toxocara* spp. Com a finalidade de avaliar a presença de anticorpos anti-*Toxocara* em frangos de corte, foram colhidas 189 amostras de sangue de frangos em um abatedouro no Norte do Paraná. Os frangos foram criados em sistema colonial/caipira (sistema semi-intensivo), em pequenas propriedades rurais (n=7) pertencentes a produtores vinculados a uma associação de pequenos produtores. Os testes sorológicos foram realizados pela técnica de ELISA indireto, utilizando-se antígenos excretórios-secretórios (TES) de *Toxocara canis* para detecção de anticorpos IgY (IgG), com preadsorção do soro com antígenos de *Ascaridia galli*, para redução de reações cruzadas. Como resultado, foi obtida uma prevalência de 67,7% (128/189; IC 95%= 61,1-74,4), com uma variação de 29.6% a 100% entre as propriedades. Não foi observada correlação entre a positividade dos animais quando comparada a área (p= 0,382) e a densidade populacional de cães por propriedade (p= 0,785). Os resultados demonstraram alta frequência de anticorpos anti-*Toxocara* em frangos de corte criados em sistema semi-intensivo, indicando que essas aves podem ser indicadores de contaminação ambiental por agentes de larva migrans. Outros estudos são necessários para avaliar os riscos associados à transmissão de toxocaríase aos humanos pelo consumo da carne de frangos criados no sistema colonial/caipira.

Palavras-chave: ELISA; *Gallus gallus domesticus*; Soroprevalência; Toxocaríase; Zoonose.

ABSTRACT

Frequency of anti-*Toxocara* antibodies in broiler chickens reared under semi-intensive system, in the State of Paraná, southern Brazil

Toxocariasis is an important zoonosis of worldwide distribution. The main way of transmission of the disease to human is the ingestion of soil containing embryonated eggs of *Toxocara* spp., the etiological agent. Studies have indicated the ingestion of raw or undercooked meat of chickens as another way of transmission. Besides, free-range chickens have been considered a good sentinel for the contamination of soil by *Toxocara* spp. eggs. The aim of this study was to evaluate the presence of anti-*Toxocara* antibodies in naturally infected broiler chickens (n=189) slaughtered in an abattoir located in Paraná, southern Brazil. The chickens were reared in a semi-intensive system by small familial farmers (n=7). An ELISA test was performed to detect the presence of anti-*Toxocara* IgY after serum adsorption with *Ascaridia galli* extract. An overall seroprevalence of 67.7% (128/189; 95% confidence interval [CI] = 61.1-74.4) was observed. The frequency of positive animals by farm ranged from 29.6% to 100%. The optical density and reactivity index indicated the possible chronicity of infection of the evaluated chickens. Associations between the presence of antibodies and the area where chickens were reared ($p = 0.382$) or the population density of dogs on the farm ($p = 0.785$) were not observed. This study shows a high frequency of *Toxocara* spp. infection in broiler chickens reared in semi-intensive systems and provides significant evidence that chickens are good indicator of environmental contamination by larva migrans agents. Further studies are necessary to assess the risk factors associated with poultry infection and the likelihood of toxocariasis transmission to humans via the ingestion of free-range chicken meat.

Keywords: ELISA; *Gallus gallus domesticus*; Seroprevalence, Toxocariasis, Zoonosis.

LISTA DE SIGLAS

- % – Por cento
- mL – Mililitro
- °C – Graus Celsius
- rpm – rotações por minuto
- g – Força centrífuga
- IC – Intervalo de confiança
- μL – Microlitro
- μm – Micrômetro
- p – Nível de significância
- n – Número de amostras
- ELISA - Ensaio imunoenzimático

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
2	ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA.....	27
	ANEXO A - RESULTADO DE TESTE DE ELISA INDIRETO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-TOXOCARA SPP. EM FRANGOS CRIADOS EM SISTEMA SEMI-INTENSIVO OBTIDOS EM UM ABATEDOURO NO NORTE DO PARANÁ, BRASIL. 2017. LEITURA CONSIDERADA COMO A MÉDIA DA DO (DENSIDADE ÓTICA) + 4 DP (DESVIO PADRÃO) DO CUT-OFF. RESULTADOS ACIMA DE 1 FORAM CONSIDERADOS POSITIVO.....	44

*** 1 ARTIGO CIENTÍFICO**

Frequência de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos criados em sistema semi-intensivo,
no Norte do Paraná, Sul do Brasil.

Adilson Oliveira Cardoso¹, Guita, Rubinske-Elelfant², Yslla Fernanda Fitz Balo Merigueti¹,
Vamilton Alvares Santarém^{3**}, Aline da Silveira Batista¹

(1) Discente: Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

(2) Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

(3) Docente: Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva II- Hospital Veterinário, Unoeste.

* Normas para Publicação. Normas para Publicação. Parasitology Research. Disponível em: <http://www.springer.com/biomed/medical+microbiology/journal/436>

** Autor para correspondência: Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares Km 572, Bairro Limoeiro - Presidente Prudente, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil. Tel/Fax: +55 18 3229 207. E-mail: vamilton@unoeste.br

Resumo

Com a finalidade de avaliar a presença de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos de corte, foram colhidas 189 amostras de sangue de frangos em um abatedouro no Norte do Paraná. Os frangos foram criados em sistema colonial/caipira (sistema semi-intensivo), em pequenas propriedades rurais (n=7) pertencentes a produtores vinculados a uma associação de pequenos produtores. Os testes sorológicos foram realizados pela técnica de ELISA, utilizando-se antígenos excretórios-secretórios (TES) de *Toxocara canis* para detecção de anticorpos IgY (IgG), com preadsorção do soro com antígenos de *Ascaridia galli*, para redução de reações cruzadas. Como resultado, foi obtida uma frequência de 67,7% (128/189; IC 95%= 61,1-74,4), com uma variação de 29.6% a 100% entre as propriedades. Em relação a DO (densidade ótica), 91,4% (n=117) apresentaram DO maior do que o valor de corte e menor do que o dos controles positivos ($0,165 < OD < 0,398$). Em 8,6% (n=11) a DO foi igual ou maior do que aquela observada no controle positivo (0,398). Os IRs variaram de 0,19 a 0,99 e de 1,0 a 3,4, respectivamente, para as amostras negativas e positivas (IR média= 1,36). Dos frangos positivos, 44,5% apresentaram IR entre 1,0 e 1,49; 47,7% de 1,5 a 2,4; e, 7,8%; maior do que 2,5. Não foi observada correlação entre a positividade dos animais quando comparada a área ($p= 0,382$) e a densidade populacional de cães por propriedade ($p= 0,785$). Os resultados do nosso estudo demonstraram a alta frequência de anticorpos anti-*Toxocara* em frangos de corte criados em sistema semi-intensivo.

Palavras-chave: ELISA; *Gallus gallus domesticus*; Soroprevalência; Toxocaríase; Zoonose.

1. Introdução

Das diversas fontes de proteínas conhecidas, a carne e os ovos de galinha representam os mais consumidos em todo mundo. Essas aves são criadas em uma variedade de sistemas de produção, desde a criação a campo ou semi-intensivo, até em condições totalmente controladas e automatizadas (FAO 2017).

A criação em sistema colonial/caipira exige pequeno investimento levando a mais de 50% das famílias rurais utilizarem a avicultura como fonte de renda e consumo familiar (Sonaiya e Swan 2004). A tendência mundial em consumir produtos cada vez menos processados, inclusive a carne de frango é outro estimulador da criação em sistema colonial/caipira (Figueiredo 2014). Apesar das vantagens oferecidas por esse sistema de criação, as aves são expostas a um maior número de agentes presentes no ambiente, principalmente aos parasitos, devido ao seu hábito de alimentação que envolve o consumo de nutrientes presentes no solo (Ben Slimane 2016; Ferdushy et al. 2016; Javaregowda et al. 2016). Em Bangladesh, foi observado que aves criadas em vida livre foram mais suscetíveis à infecção por parasitos de frangos em relação às aves criadas em sistema intensivo (Rabbi et al. 2006).

A criação de aves em sistema semi-intensivo ou extensivo em propriedades com a presença de cães e gatos aumenta o risco de contaminação de carne e produtos por helmintos que podem ser transmitidos ao ser humano, pela ingestão de carne crua ou mal cozida de frangos (Cardozo e Yamamura, 2004; Taira et al. 2004; Moreira et al. 2014; Zibaei et al. 2016), como é o caso da toxocaríase, zoonose de distribuição mundial e considerada uma das mais prevalentes na população humana (Rubinsky-Elefant et al. 2010).

Estudos sobre a infecção natural por *Toxocara* spp. em frangos são escassos na literatura e são restritos às recentes pesquisas realizadas no Brasil, onde foi verificada alta prevalência de anticorpos anti-*Toxocara* em frangos de vida livre comercializados em feiras de Feira de Santana, Bahia (von Söhsten 2017) e de diferentes origens, em Vila Velha, Espírito Santo (Campos-da-Silva et al. 2015). Estes estudos, entretanto, não avaliaram dados referentes aos fatores envolvidos na infecção das aves.

O presente trabalho teve como objetivo estudar possíveis fatores de risco e a prevalência de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos (*Gallus gallus domesticus*) abatidos oriundos de uma cooperativa formada por proprietários de pequenas áreas rurais em sistema colonial/caipira no Norte do Paraná, Brasil.

2. Materiais e método

2.1 Local do Estudo

O soro dos frangos avaliados no estudo foi obtido em um abatedouro localizado no município de Barra do Jacaré, estado do Paraná, Sul do Brasil (23° 06' 54" S; 50° 10' 53" W).

O abatedouro foi selecionado por participar da cadeia de produção de um grupo de pequenos produtores com pequenas propriedades (média= 8 hectares) em sistema de cooperação (n= 7 propriedades). As unidades de produção agropecuárias têm como principal fonte de renda familiar a produção de frangos de corte.

O abatedouro, que é a sede da cooperativa, adquiria mensalmente, de uma indústria de frangos, 2000 animais (linhagem Label Rouge) com um dia de vida. Na mesma propriedade onde se localiza o abatedouro, os pintainhos foram mantidos por 30 dias para adaptação em galpões (250m²) de piso cimentado, alimentados com ração à base de milho (*Zea mays*) e água *ad libitum*.

Após o período de adaptação, 1000 aves foram transferidas para as propriedades pertencentes ao grupo. O sistema foi adotado de maneira contínua entre o abatedouro e as sete propriedades.

Nas propriedades, os frangos foram criados em sistema semi-intensivo (área de 1200 a 5000 m²), mantidos com ração à base de milho (*Zea mays*) e água *ad libitum*. Após um ciclo de 60-90 dias, aproximadamente uma média de 100 frangos, por semana, de cada propriedade do grupo foram destinadas ao abatedouro.

Todas as informações sobre a área de criação das aves, número de cães e gatos, relacionadas às propriedades, foram fornecidas pelo gerente do abatedouro.

2.2 Coleta de amostras

As amostras de sangue dos frangos foram coletadas, semanalmente, entre maio a julho de 2016.

A coleta foi de 27 amostras por propriedade, em um total de 189 amostras.

As amostras de sangue foram obtidas obedecendo ao fluxograma de abate. Os tubos contendo o sangue foram centrifugados (1650g; 10 minutos), para a obtenção de soro, e este foi transferido para criotubos, armazenados a -20°C até o seu processamento.

2.3. Preparo do Antígeno

Antígenos secretórios-excretórios de L3 de *T. canis* (TES) foram obtidos de acordo com o método descrito por Elephant et al. (2006). Ovos foram coletados do útero de fêmeas adultas de *T. canis*, e após um período de incubação (28°C) de aproximadamente um mês em formalina 2%, as larvas foram recuperadas, após a eclosão artificial dos ovos.

As larvas foram mantidas em meio Eagle's (37°C), e a cultura do sobrenadante contendo o TES foi semanalmente transferida para frascos estéreis. O sobrenadante foi tratado com 200 mM de inibidor de fluoreto de protease (fenil-metil-sulfonil, Sigma®, St. Louis, MO), concentrado 50 a 100 vezes em Aparelho Amicon Ultrafiltration (Millipore®, Danvers, MA, EUA), dialisado com água destilada, centrifugado (18500 x g, 60 min, 4° C), e filtrado com Membranas Millipore 0.2 µm. O método de Lowry foi utilizado para mensurar a concentração de proteína (Lowry et al. 1951).

2.4 Adsorção do soro com extrato de *Ascaridia galli* (AWE)

Levando em consideração que as aves vivem em contato direto com o solo e são suscetíveis à infecções por outros geohelmintos, além do *Toxocara* spp., antes da realização do ELISA, foi realizada adsorção com antígenos de *Ascaridia galli*, para minimizar a reação cruzada com anticorpo de *Toxocara* spp., e consequentemente aumentar a especificidade do teste (Campos-da-Silva et al. 2015; von Sohsten et al. 2017).

Para obtenção de AWE, foi seguido o protocolo descrito por Romasanta et al. (2003) e Elefant et al. (2006). Primeiramente os adultos de *A. galli* foram recuperados do intestino de frangos naturalmente infectados. Posteriormente, os parasitos foram macerados em água destilada e receberam NaOH, até a concentração de 0.15 M. O material foi incubado (temperatura ambiente, 2 horas) e neutralizado com HCl 6M. O extrato foi tratado com éter para remoção dos lipídios e após esse procedimento o material foi centrifugado (18500 g; 20 min a 4°C).

A fase aquosa foi removida e filtrada (0,22 µm membrana Millipore). O soro foi pré-incubado com uma concentração final de 25 µg/mL AWE em 0,01 M de fosfato tampão salina (PBS, pH 7,2), contendo 0.05% de Tween 20 (PBS-T) (Sigma®, St. Louis) (37°C; 30 min).

2.5 Teste de ELISA indireto para a detecção de IgY anti-*Toxocara*

Para avaliação de anticorpos (IgY) anti-*Toxocara* (IgG), foi adotado o teste de ELISA indireto (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*- Ensaio Imunoenzimático) baseado no protocolo descrito por De Savigny et al. (1979), com algumas modificações (Elefant et al. 2006). Sucintamente, placas de 96 poços de poliestireno (100 µL/poço) (Corning, Costar, New York, NY) foram cobertas com o TES diluído em 0.01M de PBS (pH 7.2) na concentração de 1.9 µg/mL. Posteriormente, o material foi incubado (37°C, 2 h seguido por 4°C, 18 h), os poços lavados e cada um deles preenchido com 200 µL albumina de soro bovino 1% (BSA, Sigma, St. Louis, USA) em PBS-T 20, e submetido à incubação (37°C, 1 h).

Depois da lavagem, as amostras de soro (100 µL/poço) foram diluídas a 1:200 e incubadas em duplicata (37°C, 40 min). As placas foram então lavadas e submetidas à incubação (100µL/poço) com IgY-peroxidase anti-galinha produzido em coelhos (A9046-Sigma-Birmingham, AL, USA) e diluído a 1:40000 em PBS-T (37°C, 40 min).

O material foi lavado e foi adicionado como substrato cromogênico a solução de tetrametilbenzidina (TMB-BD[®], San Diego, CA, USA) (100 µL/poço). Após incubação (37°C, 6 min), a reação foi interrompida com solução de H₂SO₄ 2N (50 µL/poço). As leituras foram feitas com absorbância de 450 nm (Titertek Multiskan MCC/340, Lab-System, Finlândia).

Os ciclos de lavagem estabelecidos no teste ELISA consistiram de três ciclos de cinco minutos em PBS-T 20.

Os controles de soro positivo e negativo usados no nosso estudo e naquele conduzido por von Söhsten et al. (2017) foram os mesmos obtidos em um estudo experimental, em que três grupos de frangos foram infectados com diferentes doses infectantes (100; 1000 e 5000) de ovos de *T. canis* (Raposo et al. 2014).

De acordo com Raposo et al. (2014), o teste de ELISA é altamente eficiente (acurácia de 97%; sensibilidade 96,8% e especificidade de 100%) para a detecção de IgY aos 60 dias pós- infecção, independente da dose infectante.

Todas as amostras foram avaliadas em duplicata, e a densidade ótica (OD) final foi determinada a partir da média das duplicatas. Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IRs), calculado pela razão entre os valores de absorbância de cada teste e o valor do ponto de corte (cut-off) ($RI = DO \text{ amostras} / DO \text{ cut-off}$). Amostras que apresentaram RIs superiores a 1 foram consideradas positivas.

2.6 Análises de resultados

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a relação entre as variáveis: 1) área onde as aves eram criadas e 2) a densidade populacional de cães por fazenda (m^2), em relação à frequência de aves positivas no ELISA. O intervalo de confiança de 95% foi obtido utilizando o método de Wilson, de acordo com Sundar Dorai-Raj (2014), com uso do pacote do software R (2016).

3. Resultados

Nossos resultados indicam uma positividade para anticorpos (IgY) anti-*Toxocara* spp. de 67,7% (128/189; IC 95%= 61,1-74,4) em frangos criados em sistema semi-intensivo, pelo teste de ELISA.

A tabela 1 resume a DO, IRs e a frequência de aves positivas por propriedade. Foi observada que a positividade no teste de ELISA variou de 29,6% a 100%.

O cálculo do valor de corte foi baseado no valor da DO do controle negativo (0,087) adicionado a 4 desvios-padrões ($4 \times 0,0194 = 0,078$), resultando em 0,165.

Foi comparada a DO dos animais com aquelas dos controles positivos e negativos. Foi observado que 91,4% (n=117) apresentaram DO maior do que o valor de corte e menor do que o dos controles positivos ($0,165 < OD < 0,398$). Em 8,6% (n=11) a DO foi igual ou maior do que aquela observada no controle positivo (0,398).

Os IRs variaram de 0,19 a 0,99 e de 1,0 a 3,4, respectivamente, para as amostras negativas e positivas (IR média= 1,358). Dos frangos positivos, 44,5% apresentaram IR entre 1,0 e 1,49; 47,7% de 1,5 a 2,49; e, 7,8%; maior do que 2,5 (Figura 1).

O número de cães por propriedade variou de 1 a 12 (média= 3,9), e a área onde os frangos eram criados variou de 120 a 5000 m² (média= 2293m²).

Levando em consideração a frequência de amostras positivas no ELISA, não foi observada correlação quando comparada a área (p= 0,382) ou a densidade de cães (p= 0,785) com a frequência de animais positivos.

4. Discussão

No presente estudo, foi avaliada a presença de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos criados em sistema semi-intensivo, e abatidos em um abatedouro no Sul do Brasil. A soroprevalência obtida em nosso estudo foi de 67,7%. No Brasil, a alta frequência de anticorpos IgY anti-*Toxocara* spp. também foi detectada pelo ELISA no soro de frangos com diferentes origens, criados em sistema de vida livre (Campos-da-Silva et al. 2015), e frangos de corte comercializados em feiras livres (von Söhsten et al. 2017), com positividade 58,5% e 89,9%, respectivamente.

Frangos criados em sistema semi-intensivo são altamente infectados por parasitas de aves (Ben Slimane 2016; Ferdushy et al. 2016; Javaregowda et al. 2016) e podem facilmente ingerir os estágios infectantes de muitos geoparasitos devido ao hábito de ciscar e ingerir pequenas partículas do solo enquanto se alimentam (Rabbi et al. 2006).

Pesquisadores observaram que frangos criados em quintais são mais susceptíveis à infecção por geoparasitos do que frangos de corte criados em sistema intensivo em Bangladesh (Rabbi et al. 2006). Assim, o alto número de frangos sororeagentes em nosso estudo está dentro das expectativas, uma vez que os frangos de corte eram criados semi-intensivamente em áreas facilmente acessadas por cães.

Além disso, a adsorção do soro com antígenos de *A. galli* foi adotada para minimizar a reação cruzada (Elefant et al. 2006; Campos-da-Silva et al. 2015; von Sohsten et al. 2017). Estes últimos autores observaram que o tratamento prévio com soro de frangos com antígenos de *A. galli* reduziu aproximadamente 15% os valores de densidade óptica obtidos no ELISA.

Em um estudo experimental utilizando frangos como modelo animal (da Silva Raposo et al. 2016), foi observado um aumento progressivo no IR, caracterizando uma tendência de cronicidade da infecção por *T. canis* (IR= 1,6; 2,2 e 2,1, respectivamente, para frangos infectados com 100, 1000 e 5000 ovos). No presente estudo, a maioria dos frangos mostrou IR maior do que 1,5, mais baixo do que o IR (média RI= 2,03) observado em frangos comercializados em feiras-livres (von Söhsten et al. 2017).

Nós avaliamos amostras de frangos: 1) com a mesma alimentação; 2) expostos ao mesmo sistema de criação; 3) expostos por período de tempo determinado (60-90 dias), excluindo algumas variáveis de confundimento associadas à infecção, particularmente o período de exposição das aves.

Campos-da-Silva et al. (2015) consideraram que frangos podem ser categorizados em relação à resposta contra *Toxocara* spp. com base nos perfis de DO. Se a DO é maior que a DO que a do controle-negativo e inferior a do controle positivo, podem ser classificados como: tiveram contato com o agente (infecção passada); ou, infectados por outros nematódeos (infecção cruzada). Os frangos com DOs iguais ou maiores que as do controle-positivo provavelmente possuem infecção recente por *Toxocara* spp.

Nós observamos que a maioria das aves (91,4%) apresentou DO maior do que o valor de corte e menor do que o controle-positivo. Levando em consideração o IR e a DO, não é plausível considerar que os frangos avaliados haviam se infectado progressivamente, uma vez que o ciclo de vida das aves foi curto (cerca de 90 dias). Assim, a presença de anticorpos provavelmente ocorreu como consequência de uma infecção prévia, e a persistência de IgY reforça hipótese de que a infecção dos frangos por *Toxocara* tende a ser crônica.

No presente estudo, a frequência de frangos soropositivos, por propriedade, variou de 29,6 a 100%. A variação de anticorpos anti-*Toxocara* tem sido considerada como dependente da origem dos frangos. Campos-da-Silva et al. (2015) observaram prevalências variáveis de anticorpos ao avaliarem amostras de frangos de pequenas fazendas (78,6%), criados em quintais (57,0%), de abatedouros (42,8%), e necropsiados em uma Universidade (42,5%). Outro estudo, realizado durante oito meses, apresentou resultados similares (variação de 50,0% a 100%) ao analisar amostras de frangos vendidos em feiras (von Söhsten et al. 2017).

Alguns fatores de risco têm sido associados à toxocaríase. Em humanos, a doença tende a ser mais prevalente em áreas rurais, onde a presença de cães e a contaminação do solo são frequentes (Rubinsky-Elefant et al. 2010). Desta forma, é possível considerar que frangos criados extensivamente ou semi-intensivamente, em ambiente rural, são comumente expostos a ovos de *Toxocara*.

As aves avaliadas no nosso estudo viviam em ambientes coabitados por animais de companhia, principalmente cães. A frequência de positividade do ELISA, entretanto, não foi associada com a densidade populacional de cães nas fazendas ou com a área onde as aves eram criadas. Nosso estudo avaliou baixo número de propriedades (n=7), o que provavelmente, limitou a avaliação de fatores de risco associados à infecção.

Artigos publicados recentemente têm mostrado a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em frangos de vida livre, incluindo o Brasil (Feitosa et al. 2016; Lopes et al. 2016; Magalhães et al. 2016; Souza et al. 2016). Esses animais têm sido considerados excelentes sentinelas e um dos melhores indicadores de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* (Dubey et al. 2006; Dubey 2010). Sugestões similares foram feitas por Campos-da-Silva et al. (2015) em relação ao papel dos frangos como sentinelas para a contaminação do solo por ovos de *Toxocara*, fato reforçado pelas nossas conclusões.

Em nosso estudo, não foi possível avaliar a presença de larvas nos tecidos dos frangos. Zibaei et al. (2016) demonstraram a presença de larvas de *Toxocara* no tecido de frangos de corte. Após amplificação de DNA pela PCR, os autores observaram que 83,3% eram de *T. canis* e 16,7% de *T. cati*. Os autores concluíram que frangos de corte podem ser hospedeiros paratênicos naturais de espécies de *Toxocara*, e que essas larvas nos tecidos das aves podem ser agentes de toxocaríase em humanos quando esses consomem a carne crua ou mal cozida das aves, como descrito por Nagakura et al. (1989) e Morimatsu et al. (2006).

Baseado nas condições em que os frangos foram criados e o alto nível de anticorpos observado em nosso estudo e por outros autores (Campos-da-Silva et al. 2015; von Söhsten et al. 2017) é importante levar em consideração que frangos em sistema livre de criação são fonte de infecção para humanos e animais, com especial atenção para fazendeiros/pessoas que estão envolvidas com esse tipo de sistema de criação.

Estudos futuros são necessários para avaliar os fatores de risco associados à infecção de frangos por *Toxocara* spp. e determinar a quantidade de reação cruzada no teste ELISA, além do papel dessas aves na transmissão da toxocaríase aos seres humanos.

Os resultados do presente estudo demonstraram alta frequência de anticorpos anti-*Toxocara* em frangos corte criados em sistema semi-intensivo. Esses animais podem servir como sentinela natural para a contaminação do solo por ovos de *Toxocara* spp.

Referências

- Ben Slimane B (2016) Prevalence of the gastro-intestinal parasites of domestic chicken *Gallus domesticus* Linnaeus, 1758 in Tunisia according to the agro-ecological zones. *J Parasit Dis* 40: 774–778
- Campos-da-Silva DR, Paz JS, Fortunato VR, Beltrame MAV (2015). Natural infection of free-range chickens with the ascarid nematode *Toxocara* sp. *Parasitol Res* 114:4289–4293
- Cardoso SP, Yamamura MH (2004) Parasitas em produção de frangos no sistema de criação tipo colonial/caipira no Brasil. *Semina: Ci Agr* 25:63-74
- da Silva Raposo R, Santarém VA, Meriguetti YF, Rubinsky-Elefant G, de Lima Cerazo LM, Pereira L, Zampieri BP, da Silva AV, Laposy CB (2016) Kinetic and avidity of IgY anti-*Toxocara* antibodies in experimentally infected chickens. *Exp Parasitol* 171:33-41
- Dubey JP, Gennari SM, Labruna MB, Camargo LM, Vianna MC, Marcet PL, Lehmann T (2006) Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. *J Parasitol* 92:36-40
- Dubey JP (2010) *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoon Public Hlth* 57:60-73.
- Elefant GR, Shimizu SH, Sanchez, MCA, Jacob CMA, Ferreira AW (2006) A serological follow-up of toxocaríasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Lab Anal* 20:164-172
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (2017) Poultry and Animal Production. Updated on: 6 March 2014. Available at: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/poultry/production.html>. Access: 18 April 2017
- Feitosa TF, Vilela VL, de Almeida-Neto JL, dos Santos A, de Moraes DF, Athayde AC, de Azevedo SS, de Jesus Pena HF (2016) First study on seroepidemiology and isolation of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in the semi-arid region of Paraíba state, Brazil. *Parasitol Res* 115:3983-3990

Ferdushy T1, Hasan MT, Golam Kadir AK (2016) Cross sectional epidemiological investigation on the prevalence of gastrointestinal helminths in free range chickens in Narsingdi district, Bangladesh. *J Parasit Dis* 40:818-822

Figueiredo EAP (2014) Produção de Aves: avicultura agroecológica é possível. *Rev CFMV* 20:29-32

Javaregowda AK, Kavitha Rani B, Revanna SP, Udupa G (2016) Prevalence of gastrointestinal parasites of backyard chickens (*Gallus domesticus*) in and around Shimoga. *J Parasit Dis* 40:986-990

Lopes CS, Franco PS, Silva NM, Silva DA, Ferro EA, Pena HF, Soares RM, Gennari SM, Mineo JR (2016) Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. *Epidemiol Infect* 144:1865-75

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275

Magalhães FJ, da Silva JG, Ribeiro-Andrade M, Pinheiro JW Júnior, Aparecido Mota R (2016) High prevalence of toxoplasmosis in free-range chicken of the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Acta Trop* 159:58-61

Moreira GM, Telmo Pde L, Mendonça M, Moreira AN, McBride AJ, Scaini CJ, Conceição FR (2014) Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol* 30:456-64

Morimatsu Y, Akao N, Akiyoshi H, Kawazu T, Okabe Y, Aizawa H (2006) A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am J Trop Med Hyg* 75:303-306

Nagakura K, Tachibana H, Kaneda Y, Kato Y (1989). Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *J Infect Dis* 160:735-736

Rabbi, A.K.M.A. (2006) Gastrointestinal helminths infection in different types of poultry. *Bangl J Vet Med* 4: 13-18

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R Software: A Language and Environment for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>

Romasanta A, Romero JL, Arias M, Sánchez-Andrade R, López C, Suárez JL, Díaz P, Díez Baños P, Morrondo P, Paz-Silva A (2003). Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays-analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol Invest* 32: 131-142

Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira UM (2010) Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Ann Trop Med Parasitol* 104: 3-23

Sonaiya EB, Swan SEJ (2004) Manual of small scale poultry production. Technical guide. Available at: www.fao.org/docrep/008/y5169e00.htm Access: 18 April 2017

Sousa IC, Pena HF, Santos LS, Gennari SM, Costa FN (2016) First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens on São Luis island, Maranhão state, Brazil, with a new genotype described. *Vet Parasitol* 223:159-64

Sundar Dorai-Raj (2014). binom: Binomial Confidence Intervals For Several Parameterizations. R package version 1.1-1. Available at: < <https://CRAN.R-project.org/package=binom>>

Taira K, Saeed I, Permin A, Kapel CMO (2004) Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Vet Parasitol* 121:115–124

von Söhsten AL, Silva AV, Rubinsky-Elefant G, Macedo LMS, Guerra M (2017) Anti-*Toxocara* spp. IgY antibodies in poultry sold in street markets from Feira de Santana, Bahia, Northeastern Brazil. *Vet Parasitol: regional studies and reports* 8:86-89

Zibaei M, Sadjjadi SM, Maraghi S (2016) The occurrence of *Toxocara* species in naturally infected broiler chickens revealed by molecular approaches. *J Helminthol* 30:1-4

Tabela 1 – Densidade Ótica (DO) e Índices de Reatividades (IR) médios, e frequência de anticorpos (IgY) anti-*Toxocara* spp. detectados pelo teste de ELISA indireto em frangos criados em sistema semi-intensivo obtidos em um abatedouro no Norte do Paraná, Brasil. 2017.

Propriedade	DO \pm dp	IR \pm dp	Resultado ELISA			
			Positivo		Negativo	
			N	% (IC 95%)	N	%
I	0,310 \pm 0,077	1,881 \pm 0,466	26	96,3 (81,7-99,3)	1	3,7
II	0,301 \pm 0,085	1,826 \pm 0,515	27	100,0 (87,5-100,0)	0	0,0
III	0,271 \pm 0,094	1,641 \pm 0,570	25	92,6 (76,6-97,4)	2	7,4
IV	0,212 \pm 0,079	1,288 \pm 0,478	21	77,8 (59,2-89,4)	6	22,2
V	0,167 \pm 0,063	1,009 \pm 0,379	11	40,7 (24,5-59,3)	16	59,3
VI	0,155 \pm 0,049	0,942 \pm 0,297	8	29,6 (15,6-48,5)	19	70,4
VII	0,152 \pm 0,054	0,919 \pm 0,330	10	37,0 (21,5-55,8)	17	63,0
Total	0,224 \pm 0,071	1,092 \pm 0,434	128	67,7 (60,8-74,0)	61	32,3

DO: Densidade Ótica; IR: Índice de reatividade; N: número; IC: Intervalo de Confiança

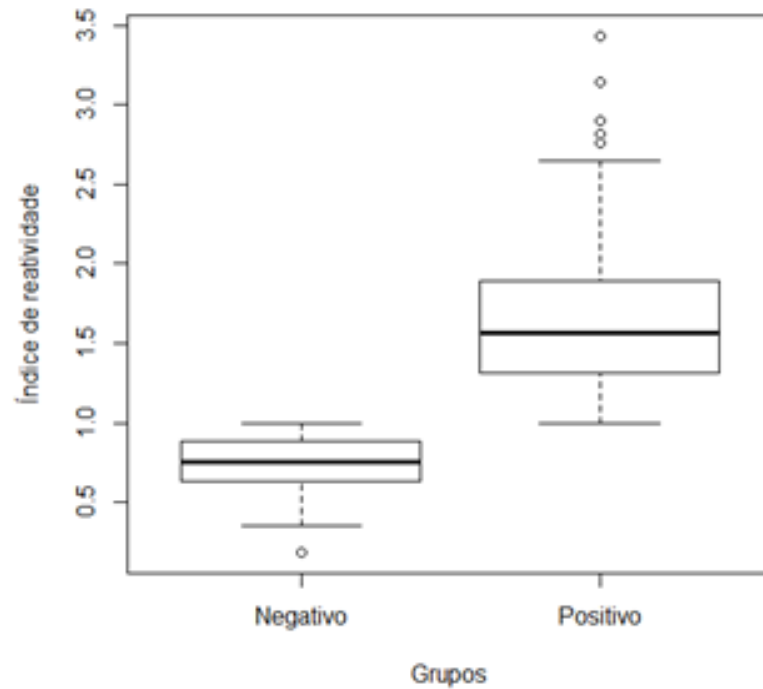


Figura 1 – Box-plot apresentando a distribuição dos Índices de Reatividade de anticorpos de anticorpos (IgY) anti-*Toxocara* spp, detectados pelo teste de ELISA indireto em frangos criados em sistema semi-intensivo obtidos em um abatedouro no Norte do Paraná, Brasil. 2017.

2 ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA

High frequency of anti-*Toxocara* antibodies in slaughtered broiler chickens

Adilson Cardoso de Oliveira¹, Guita Rubinsky-Elefant², Aline da Silveira Batista¹, Yslla Fernanda Fitz Balo Merigueti¹, Vamilton Alvares Santarém^{3*}

1 Post-Graduate Program in Animal Science. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

2 Laboratory of Seroepidemiology and Immunobiology- Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

3 Post-Graduate Program in Animal Science. Laboratory of Veterinary Parasitology, Veterinary Teaching-Hospital (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

Corresponding Author: Laboratório de Parasitologia Veterinária, Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Raposo Tavares Km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. CEP: 19067-175. Phone: +5518 32292077. E-mail: vamilton@unoeste.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate the presence of anti-*Toxocara* antibodies in naturally infected broiler chickens (n=189) slaughtered in an abattoir in southern Brazil. The chickens were reared in a semi-intensive system by small familial farmers (n=7). An ELISA test was performed to detect the presence of anti-*Toxocara* spp. IgY after serum adsorption with *Ascaridia galli* extract. An overall seroprevalence of 67.7% (128/189; 95% confidence interval [CI] = 61.1-74.4) was observed. The frequency of positive animals by farm ranged from 29.6% to 100%. The optical density and reactivity index indicated the possible chronicity of infection of the evaluated chickens. Associations between the presence of antibodies and the area where chickens were reared ($p = 0.382$) or the population density of dogs on the farm ($p = 0.785$) were not observed. This study shows a high prevalence of *Toxocara* spp. infection in broiler chickens reared in semi-intensive systems and provides significant evidence that chickens are a good indicator of environmental contamination by larva migrans agents. Further studies are necessary to assess the risk factors associated with poultry infection and the likelihood of toxocariasis transmission to humans via the ingestion of free-range chicken meat.

Key words: ELISA; *Gallus gallus domesticus*; seroprevalence; toxocariasis; zoonosis.

1. Introduction

Poultry, one of the most important and rich sources of protein for humans, are reared intensively in fully automated, environmentally controlled systems, or even in backyards under semi-intensive systems (FAO 2017).

Backyard production methods imply low biosecurity measures and a high risk of infectious diseases (Conan et al. 2012; Ibrahim et al. 2016). Free-range chickens, for instance, harbour a wide variety of geo-parasites, becoming highly infected during feeding (Ben Slimane 2016; Ferdushy et al. 2016; Javaregowda et al. 2016). In Bangladesh, chickens reared in backyards were significantly more susceptible to infections by parasites than those reared in an intensive system (Rabbi et al. 2006).

Chickens have been considered sentinels for environmental contamination by soil-borne parasitic diseases (Cardoso, Yamamura 2004), mainly toxoplasmosis, a zoonosis that may be transmitted to humans via the ingestion of undercooked, infected chicken meat (Dubey 2010).

Chickens are also considered as a sentinel for soil contamination by the eggs of dog/cat *Toxocara* spp. (Campos-da-Silva et al. 2015; von Söhsten et al. 2017), a nematode responsible for human toxocariasis, one of the most prevalent helminthiases in the world (Rubinsky-Elefant et al. 2010). Toxocariasis is primarily transmitted to humans via the ingestion of soil containing embryonated eggs; however, the consumption of raw or undercooked meat from these animals may also represent an alternative route of transmission to humans (Nagakura et al. 1989; Taira et al. 2004; Morimatsu et al. 2006).

Recent studies on natural infections in free-range chickens have shown a high prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in poultry commercialized in street markets (von Söhsten et al. 2017) and from different origins (Campos-da-Silva et al. 2015), along with the presence of *Toxocara* larvae (*T. canis* and *T. cati*) in the tissues of the animals (Zibaei et al. 2016).

Despite the high prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in chickens, there is a lack of information regarding the factors associated with the infection.

In our study, we aim to evaluate the presence of anti-*Toxocara* IgY antibodies in slaughtered broiler chickens, in addition to other factors associated with the infection.

2. Materials and methods

2.1 Study area

The serum samples of the chickens evaluated in this study were obtained in a slaughterhouse located in the municipality of Barra do Jacaré, state of Paraná, southern Brazil (23° 06' 54" S; 50° 10' 53" W).

2.2 Farms and animals

The slaughterhouse was selected based on their management of an association of small farms (n=7) that were characterized by family maintenance, covered a small area (average = 8 hectares), and produced broiler chickens as the major source of family income.

From the association, the slaughterhouse obtained animals (lineage Label Rouge), aged one day, from a chick industry. These birds were kept for a 30-day adaptive period in a shed (250 m²) belonging to the slaughterhouse. During this period, the chicks were reared in a concrete shed base, fed with rations based on corn (*Zea mays*) and given water *ad libitum*. Following the adaptive period, 1000 animals were then transferred to the farms to be reared in cycles of 60-90 days.

On the farms, chickens were reared in a semi-intensive system (area from 1200 to 5000 m²) and given rations based on corn (*Zea mays*) and water *ad libitum*.

All the information regarding their properties was provided by the slaughterhouse manager.

2.3 Sample collection

The samples were obtained from May to July 2016. The sample collection was performed weekly to obtain samples of chicken reared on different farms.

The number of samples was established to be 25 animals (25% of the 100 chickens returned to slaughter weekly), but 27 samples were collected, for a total of 189 samples.

Blood samples were obtained in vacuum tubes following the slaughter of the chickens. The tubes were centrifuged (1650 g; 10 min) to obtain the serum samples, which were transferred into cryotubes and stored at -20°C for processing.

2.4 Antigen preparation

T. canis excretory-secretory L₃ antigens (TES) were obtained according to a previously described method (Elefant et al. 2006). Briefly, *T. canis* eggs were collected from the uteruses of female *T. canis* adult worms. Following an incubation (28°C) period of approximately one month in 2% formalin, larvae were recovered after egg hatching. The larvae were kept in serum-free Eagle's medium (37°C), and the culture supernatant containing the TES was transferred to sterile flasks each week. Then, the supernatant was treated with 200 mM of the protease inhibitor phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (Sigma®, St. Louis, MO), concentrated with Amicon Ultrafiltration units (Millipore®, Danvers, MA, USA), dialysed against distilled water, centrifuged (18500 x g, 60 min, 4°C), and filtered with 0.2-µM Millipore membranes. Protein concentration measurements were performed using Lowry's method (Lowry et al. 1951).

2.5 *Ascaridia galli* adult worm extract (AWE)

Birds living in direct contact with soil are susceptible to infection by transmission of other soil-borne helminths, in addition to *Toxocara* spp. Before performing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the chicken serum was treated with *Ascaridia galli* antigen suspension to minimize the cross-reactivity with *Toxocara* antibodies and, consequently, to increase its specificity (Campos-da-Silva et al. 2015; von Söhsten et al. 2017).

To obtain the AWE, we followed the previously described protocol (Romasanta et al. 2003; Elefant et al. 2006). First, adult *A. galli* were recovered from the bowel of a naturally infected chicken. The worms were then macerated in distilled water, receiving additional NaOH until a final concentration of 0.15 M was obtained. The material was then incubated (room temperature; 2 hours) and neutralized with 6 M HCl. Thereafter, the extract was treated with ether to remove the lipids and centrifuged (18500 g; 20 min; 4°C). The aqueous phase was removed and filtered (0.22-µM Millipore membrane). The sera were pre-incubated to a final concentration of 25 µg/mL AWE in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) with 0.05% Tween 20 (PBS-T) (Sigma[®], St. Louis) (37°C; 30 min).

2.6 Indirect ELISA test for IgY anti-Toxocara detection

An indirect ELISA was performed to evaluate the production of anti-*Toxocara* IgY (IgG) antibodies according to the previously described protocol (De Savigny et al. 1979) with some modifications (Elefant et al. 2006). Briefly, 96-well polystyrene plates (Corning, Costar, New York, NY) were coated (100 µL/well) with TES diluted in 0.01 M PBS (pH 7.2) to a concentration of 1.9 µg/mL. Following incubation (37°C, 2 h followed by 4°C, 18 h), the wells were washed, and thereafter, each well was blocked with 200 µL of 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, USA) in PBS-T 20 and then incubated at 37°C for 1 h.

After washing, the serum samples (100 µL/well), diluted 1:200, were incubated in duplicate (37°C, 40 min). The plates were then washed and incubated (100 µL/well) with anti-chicken IgY-peroxidase produced in rabbit (A9046-Sigma-Birmingham, AL, USA), diluted at 1:40,000, in PBS-T (37°C, 40 min).

The material was washed, and tetramethylbenzidine (TMB-BD[®], San Diego, CA, USA) was added as the chromogenic substrate (100 µL/well). Following incubation (37°C, 6 min), the reaction was stopped using a 2N H₂SO₄ solution (50 µL/well). The absorbance readings were performed at 450 nm (Titertek Multiskan MCC/340, Lab-System, Finland).

The ELISA test included three washes for 5 min each in PBS-T 20.

The positive and negative control sera used in our study and elsewhere (von Söhsten et al. 2017) were the same as those obtained in an experimental trial, in which three groups of chickens were infected with different (100, 1000, and 5000) infective doses of *T. canis* eggs (da Silva Raposo et al. 2016). According to these authors, ELISA was highly efficient (efficiency 97%, sensitivity 96.8%, specificity 100%) in the detection of IgY on the 60th day post-infection, independent of the infective dose.

All the samples were evaluated in duplicate, and the final DO was determined as the average of the duplicates. Antibody levels were expressed as reactivity indices (RIs) and were calculated from the ratio between the absorbance values of each tested sample and the cut-off value ($RI = DO \text{ sample} / DO \text{ cut-off}$). The samples with RIs greater than 1 were considered positive.

2.7 Analysis of the results

The Pearson correlation test was performed to evaluate the relationship between the density of dogs per farm (m²) and the frequency of ELISA positivity. A 95% confidence interval (CI) was obtained using the Wilson method according to Sundar Dorai-Raj (2014). All analyses were performed with R software (R Development Core Team 2013), and the results were interpreted at a 0.05 significance level.

3. Results

Our screening obtained positive results for anti-IgY anti-*Toxocara* antibodies in 67.7% (128/189; 95% CI = 61.1-74.4) of the free-range chickens by indirect ELISA test.

Table 1 summarizes the ODs, RIs, and frequencies of poultry that tested positive per farm. The ELISA positivity ranged from 29.6% to 100%.

The cut-off calculation was based on the OD value of the negative control (0.087) plus 4 SDs (4X 0.19), resulting in a value of 0.165. We compared the ODs of the positive animals with the ODs of the positive and negative controls. It was observed that 91.4% (n= 117) had ODs higher than the cut-off and lower than the positive control (PC) ($0.165 < OD < 0.398$), while in 8.6% (n=11), the OD was equal to or higher than the PC (0.398).

The RIs ranged from 0.19 to 0.99 and from 1.0 to 3.43, respectively, for the negative and positive samples (RI mean = 1.36). For chickens that tested positive, 44.5% showed RIs between 1.0 and 1.49, 47.7% from 1.5 to 2.49, and 7.8% higher than 2.5 (Fig. 1).

The number of dogs by farm ranged from 1 to 12 (mean= 3.9), and the area where chickens were reared varied from 1200 to 5000 m² (mean = 2293 m²). Considering the frequency of positive results on the ELISA test, no correlation was observed when the area ($p = 0.382$) and the density of dogs ($p= 0.785$) were compared.

4. Discussion

We screened for the presence of anti-*Toxocara* spp. antibodies in free-range chickens slaughtered in an abattoir in southern Brazil. Our data revealed a high seroprevalence of the antibodies (67.7%). In Brazil, a high frequency of anti-*Toxocara* IgY antibodies has also been detected by ELISA in the sera of free-range chickens of different origins (Campos-da-Silva et al. 2015) and also in broilers commercialized in street markets (von Söhsten et al. 2017), with positive results obtained in 58.5% and 89.9% of samples, respectively.

Chickens reared in semi-intensive systems are highly infected by poultry parasites (Ben Slimane 2016; Ferdushy et al. 2016; Javaregowda et al. 2016) and can easily ingest the infective stages of many geo-parasites due to scratching behaviours and ingesting small particles directly from the soil while taking in food (Rabbi et al. 2006). These authors observed that chickens reared in backyards were more susceptible to infection than broiler chickens reared in an intensive system in Bangladesh. Therefore, the high number of seroreagent chickens in our study is expected because the broilers were semi-extensively reared in areas that are freely accessed by dogs. In addition, serum preabsorption with *A. galli* antigen suspensions was performed to minimize cross-reactivity with *Toxocara* (Elefant et al. 2006; Campos-da-Silva et al. 2015; von Söhsten et al. 2017). In these studies, the authors observed that the pre-treatment of chicken serum with *A. galli* antigens reduced the OD values obtained in the ELISA by approximately 15%.

In an experimental study using chickens as the animal model (da Silva Raposo et al. 2016), a progressive increase in the RI was observed over the course of infection, demonstrating a tendency towards chronicity (RI = 1.6, 2.2 and 2.1, respectively, for chickens infected with 100, 1000 and 5000 eggs). In the present study, most of the chickens had RIs higher than 1.5, which were slightly lower than the RIs (mean RI = 2.03) observed in chickens that were commercialized in street markets (von Söhsten et al. 2017).

We evaluated samples of chickens 1) of the same breed; 2) exposed to the same rearing system; and 3) exposed during a defined period of time (60-90 days), excluding some confounding variables associated with the infection, particularly during the period of exposure. Campos-da-Silva et al. (2015) considered chickens with this OD profile to be in three possible groups: infected, with past infection, or infected with another nematode (cross-infection). The chickens with OD values equal to or greater than the PC likely were currently infected with *Toxocara* spp. We observed that majority (91.4%) of the chickens had an OD

higher than the cut-off and lower than the PC. Given the RI and the OD, the chickens could not have had past infections because the lifespans of the evaluated chickens were short. Therefore, the presence of antibodies was likely a consequence of a previous infection and the persistence of IgY, reinforcing the hypothesis that chicken infection by *Toxocara* is often chronic.

In this study, the frequencies of seropositive chickens ranged from 29.6 to 100%. The variation in the seropositivity of anti-*Toxocara* antibodies has been considered to be dependent on the origin of the chickens. Campos-da-Silva et al. (2015) observed differences in the prevalence rates of antibodies in evaluated samples of chickens from small farms (78.6%), backyards (57.0%), slaughterhouses (42.8%), and necropsied at a university (42.5%). Another study (von Söhsten et al. 2017) reported similar findings (50.0% to 100%) and analysed samples of birds sold at street markets across eight different months.

Some risk factors have been associated with toxocariasis. In humans, toxocariasis tends to be more prevalent in rural settings, where the presence of dogs and soil contamination are high (Rubinsky-Elefant et al. 2010; Moreira et al. 2014). Therefore, it is likely that free-range chickens reared in a rural environment are commonly exposed to *Toxocara* eggs.

The poultry evaluated in our study lived in environments that were cohabitated by pets, particularly dogs. However, the frequency of positive ELISA tests was not associated with the density of dogs on the farm or with the area where the poultry were reared. Our study evaluated a small number of farms (n=7), which likely limited the evaluation of risk factors associated with the infection.

Recently published articles have shown the presence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in free-range chickens around the world, including in Brazil (Feitosa et al. 2016; Lopes et al. 2016; Magalhães et al. 2016; Sousa et al. 2016). These animals are considered excellent sentinel animals and one of the best indicators of environmental contamination by *T.*

gondii oocysts (Dubey et al. 2006; Dubey 2010). A similar statement was made by Campos-da-Silva et al. (2015) regarding the role of free-range chickens as a sentinel of soil contamination by *Toxocara* eggs, which may be reinforced by our results.

In our study, it was not possible to evaluate the presence of larvae in the tissue of chickens. Zibaei et al. (2016) demonstrated the presence of *Toxocara* larvae (83.3% of *T. canis* and 16.7% of *T. cati*) in the tissue of broiler chickens by digesting the tissue in pepsin followed by PCR assay. The authors concluded that broiler chickens can be natural paratenic hosts for the larvae of *Toxocara* species, and in poultry, these larvae may be agents of human toxocariasis when humans consume raw, undercooked chicken meat, as observed by Nagakura et al. (1989) and Morimatsu et al. (2006).

Based on the conditions where chickens are reared and the high level of antibodies observed in our study and by others (Campos-da-Silva et al. 2015; von Söhsten et al. 2017), it is important to consider that the free-range environment may be a source of infection for humans and animals, with special attention given to the farmers who are involved in free-range chicken rearing activities.

In conclusion, the results of this study demonstrate that broiler chickens reared under semi-intensive conditions can be naturally infected by *Toxocara* species, serving as a sentinel of soil contamination by *Toxocara* eggs. Further studies are necessary to evaluate the risk factors associated with the infection of chickens by *Toxocara* spp. and to determine the amount of cross-reactivity in ELISA tests.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

Part of our research funds was provided by Dr. Aristeu Vieira da Silva, supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq grant #477764/2012-6 and for the Research Productivity Grant #308093/2013-5 to Aristeu V. Silva, Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brazil).

References

- Ben Slimane, B., 2016. Prevalence of the gastro-intestinal parasites of domestic chicken *Gallus domesticus* Linnaeus, 1758 in Tunisia according to the agro-ecological zones. *J. Parasit. Dis.* 40, 774–778.
- Campos-da-Silva, D.R., Paz, J.S., Fortunato, V.R., Beltrame, M.A.V., 2015. Natural infection of free-range chickens with the ascarid nematode *Toxocara* sp. *Parasitol. Res.* 114, 4289–4293.
- Cardoso, S.P., Yamamura, M.H., 2004. Parasitas em produção de frangos no sistema de criação tipo colonial/caipira no Brasil. *Semina: Ci. Agr.* 25, 63-74.
- Conan, A., Goutard, F.L., Sorn, S., Vong, S., 2012. Biosecurity measures for backyard poultry in developing countries: a systematic review. *BMC Vet. Res.* 8, 240.
- da Silva Raposo, R., Santarém, V.A., Merigueti, Y.F., Rubinsky-Elefant, G., de Lima Cerazo, L.M., Pereira, L., Zampieri, B.P., da Silva, A.V., Laposy, C.B., 2016. Kinetic and avidity of IgY anti-*Toxocara* antibodies in experimentally infected chickens. *Exp. Parasitol.* 171, 33-41.
- De Savigny, D.H., Voller, A., Woodruff, A.W., 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Pathol.* 32, 284-288.
- Dubey, J.P., Gennari, S.M., Labruna, M.B., Camargo, L.M., Vianna, M.C., Marcet, P.L., Lehmann, T., 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. *J. Parasitol.* 92, 36-40.

Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoon. Public. Hlth.* 57, 60-73.

Elefant, G.R., Shimizu, S.H., Sanchez, M.C.A., Jacob, C.M.A., Ferreira, A.W., 2006. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Lab. Anal.* 20, 164-172.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. Poultry and Animal Production. Updated on: 6 March 2014. Available at: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/poultry/production.html>. Access: 18 April 2017.

Feitosa, T.F., Vilela, V.L., de Almeida-Neto, J.L., dos Santos, A., de Moraes, D.F., Athayde, A.C., de Azevedo, S.S., de Jesus Pena, H.F., 2016. First study on seroepidemiology and isolation of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in the semi-arid region of Paraíba state, Brazil. *Parasitol. Res.* 115, 3983-3990.

Ferdushy, T., Hasan, M.T., Golam Kadir, A.K., 2016. Cross sectional epidemiological investigation on the prevalence of gastrointestinal helminths in free range chickens in Narsingdi district, Bangladesh. *J. Parasit. Dis.* 40, 818-822.

Ibrahim, H.M., Abdel-Ghaffar, F., Osman, G.Y., El-Shourbagy, S.H., Nishikawa, Y., Khattab, R.A., 2016. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chicken samples from delta of Egypt using ELISA, histopathology and immunohistochemistry. *J. Parasit. Dis.*, 40, 485-490.

Javaregowda, A.K., Kavitha Rani, B., Revanna, S.P., Udupa, G., 2016. Prevalence of gastrointestinal parasites of backyard chickens (*Gallus domesticus*) in and around Shimoga. *J. Parasit. Dis.* 40, 986-990.

Lopes, C.S., Franco, P.S., Silva, N.M., Silva, D.A., Ferro, E.A., Pena, H.F., Soares, R.M., Gennari, S.M., Mineo, J.R., 2016. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. *Epidemiol. Infect.* 144, 1865-1875.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Magalhães, F.J., da Silva, J.G., Ribeiro-Andrade, M., Pinheiro Júnior, J.W., Aparecido Mota, R., 2016. High prevalence of toxoplasmosis in free-range chicken of the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Acta Trop.* 159, 58-61.

Moreira, G.M., Telmo, P. de L., Mendonça, M., Moreira, A.N., McBride, A.J., Scaini, C.J., Conceição, F.R., 2014. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol.* 30, 456-464.

Morimatsu, Y., Akao, N., Akiyoshi, H., Kawazu, T., Okabe, Y., Aizawa, H., 2006. A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 303-306.

Nagakura, K., Tachibana, H., Kaneda, Y., Kato, Y., 1989. Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *J. Infect. Dis.* 160, 735-736.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R Software: A language and environment for statistical computing, 2016. Available in: <<http://www.r-project.org>>. Access: 18 March 2017.

Rabbi, A.K.M.A., Islam, A., Majumder, S., Rahman, M. H., 2006. Gastrointestinal helminths infection in different types of poultry. *Bangl. J. Vet. Med.* 4, 13-18.

Romasanta, A., Romero, J.L., Arias, M, Sánchez-Andrade, R., López, C., Suárez, J.L., Díaz, P., Díez Baños, P., Morrondo, P., Paz-Silva, A., 2003. Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays-analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol. Invest.* 32, 131-142.

Rubinsky-Elefant, G., Hirata, C.E., Yamamoto, J.H., Ferreira, U.M., 2010. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 104, 3-23.

Sousa, I.C., Pena, H.F., Santos, L.S., Gennari, S.M., Costa, F.N., 2016. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens on São Luis island, Maranhão state, Brazil, with a new genotype described. *Vet. Parasitol.* 223, 159-164.

Sundar, D-R., 2014. Binom: binomial confidence intervals for several parameterizations. R package version 1.1-1. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=binom>. Access: 18 March 2017.

Taira, K., Saeed, I., Permin, A., Kapel, C.M.O., 2004. Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Vet. Parasitol.* 121,115–124.

von Söhsten, A.L., Silva, A.V., Rubinsky-Elefant, G., Macedo, L.M.S., Guerra, M., 2017. Anti-*Toxocara* spp. IgY antibodies in poultry sold in street markets from Feira de Santana, Bahia, Northeastern Brazil. *Vet. Parasitol: regional studies and reports* 8, 86-89.

Zibaei, M., Sadjjadi, S.M., Maraghi, S., 2016. The occurrence of *Toxocara* species in naturally infected broiler chickens revealed by molecular approaches. *J. Helminthol.* 30, 1-4.

Table 1 Frequencies of anti-*Toxocara* antibodies (IgY) in free-range broiler chickens detected by indirect ELISA. State of Paraná, southern Brazil. 2017.

Farm	OD \pm sd	RI \pm sd	Positive		Negative	
			N	% (95% CI)	N	%
I	0.310 \pm 0.077	1.881 \pm 0.466	26	96.3 (81.7-99.3)	1	3.7
II	0.301 \pm 0.085	1.826 \pm 0.515	27	100.0 (87.5-100.0)	0	0.0
III	0.271 \pm 0.094	1.641 \pm 0.570	25	92.6 (76.6-97.4)	2	7.4
IV	0.212 \pm 0.079	1.288 \pm 0.478	21	77.8 (59.2-89.4)	6	22.2
V	0.167 \pm 0.063	1.009 \pm 0.379	11	40.7 (24.5-59.3)	16	59.3
VI	0.155 \pm 0.049	0.942 \pm 0.297	8	29.6 (15.6-48.5)	19	70.4
VII	0.152 \pm 0.054	0.919 \pm 0.330	10	37.0 (21.5-55.8)	17	63.0
Total	0.224 \pm 0.071	1.092 \pm 0.434	128	67.7 (60.8-74.0)	61	32.3

CI: confidence interval; N: number; OD: optical density; RI: reactivity index; sd: standard deviation

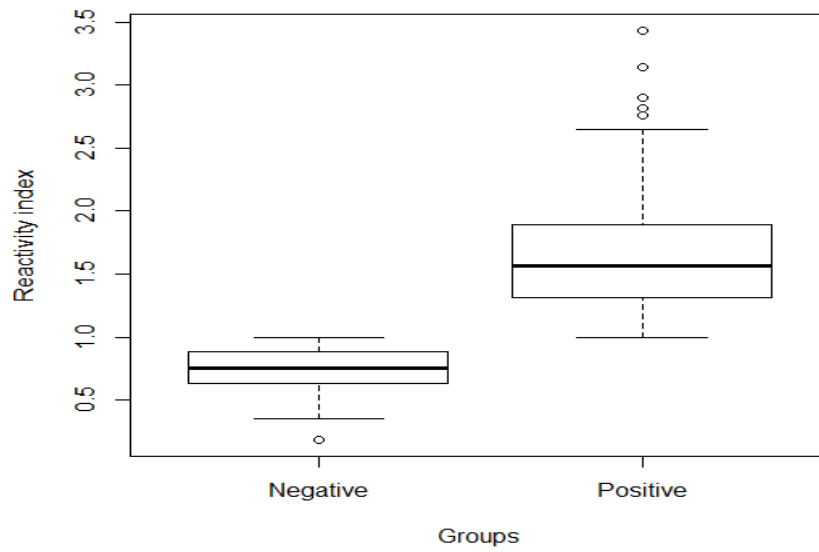


Figure 1 – Box plot representing the distribution of the reactivity indexes of anti-*Toxocara* antibodies (IgY) in free-range broiler chickens detected by indirect ELISA. State of Paraná, southern Brazil. 2017.

ANEXO A

Resultado de teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos criados em sistema semi-intensivo obtidos em um abatedouro no Norte do Paraná, Brasil. 2017. Leitura considerada como a Média da DO (densidade ótica) + 4 DP (desvio padrão) do cut-off. Resultados acima de 1 foram considerados positivos.

continua

Amostra	DO1	DO2	Média	Média + 2DP (0,126)	Média + 3DP (0,146)	Média + 4DP (0,165)
1	0,386	0,331	0,359	2,846	2,457	2,187
2	0,264	0,244	0,254	2,013	1,738	1,547
3	0,354	0,377	0,366	2,901	2,503	2,229
4	0,324	0,310	0,317	2,519	2,174	1,935
5	0,229	0,241	0,235	1,866	1,610	1,434
6	0,429	0,411	0,420	3,332	2,876	2,560
7	0,242	0,223	0,233	1,848	1,595	1,420
8	0,244	0,264	0,254	2,015	1,739	1,548
9	0,248	0,286	0,267	2,119	1,829	1,628
10	0,389	0,567	0,478	3,794	3,275	2,915
11	0,583	0,328	0,456	3,616	3,121	2,778
12	0,276	0,309	0,292	2,319	2,002	1,782
13	0,365	0,398	0,382	3,029	2,614	2,327
14	0,277	0,354	0,316	2,507	2,163	1,926
15	0,252	0,247	0,249	1,977	1,706	1,519
16	0,267	0,274	0,270	2,146	1,852	1,649
17	0,339	0,299	0,319	2,534	2,187	1,947
18	0,363	0,315	0,339	2,690	2,322	2,067
19	0,358	0,341	0,350	2,774	2,394	2,131
20	0,210	0,233	0,222	1,759	1,518	1,352
21	0,304	0,316	0,310	2,459	2,122	1,889
22	0,296	0,220	0,258	2,046	1,765	1,572
23	0,347	0,371	0,359	2,850	2,459	2,189
24	0,287	0,255	0,271	2,150	1,855	1,652
25	0,327	0,300	0,313	2,487	2,146	1,911
26	0,124	0,118	0,121	0,959	0,828	0,737
27	0,346	0,397	0,371	2,947	2,543	2,264
28	0,359	0,351	0,355	2,819	2,433	2,166
29	0,289	0,266	0,278	2,204	1,902	1,693
30	0,256	0,292	0,274	2,175	1,877	1,671
31	0,210	0,178	0,194	1,540	1,329	1,184
32	0,309	0,380	0,344	2,734	2,359	2,100
33	0,274	0,263	0,269	2,132	1,840	1,638
34	0,282	0,265	0,273	2,169	1,872	1,667
35	0,287	0,260	0,273	2,168	1,871	1,666
36	0,275	0,281	0,278	2,206	1,903	1,695
37	0,281	0,302	0,291	2,312	1,995	1,776

Resultado de teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos criados em sistema semi-intensivo obtidos em um abatedouro no Norte do Paraná, Brasil. 2017. Leitura considerada como a Média da DO (densidade ótica) + 4 DP (desvio padrão) do cut-off. Resultados acima de 1 foram considerados positivos.

continua

Amostra	DO1	DO2	Média	Média + 2DP (0,126)	Média + 3DP (0,146)	Média + 4DP (0,165)
38	0,304	0,304	0,304	2,411	2,080	1,852
39	0,352	0,342	0,347	2,756	2,378	2,117
40	0,185	0,171	0,178	1,411	1,218	1,084
41	0,233	0,211	0,222	1,760	1,518	1,352
42	0,292	0,265	0,278	2,208	1,905	1,696
43	0,449	0,424	0,436	3,464	2,989	2,661
44	0,496	0,415	0,455	3,613	3,118	2,776
45	0,266	0,285	0,275	2,186	1,886	1,679
46	0,201	0,220	0,211	1,671	1,442	1,284
48	0,504	0,534	0,519	4,120	3,555	3,165
49	0,277	0,284	0,280	2,225	1,920	1,709
50	0,401	0,421	0,411	3,261	2,814	2,505
51	0,272	0,266	0,269	2,137	1,844	1,641
52	0,426	0,417	0,421	3,344	2,886	2,569
53	0,245	0,242	0,244	1,933	1,668	1,485
54	0,247	0,279	0,263	2,087	1,801	1,603
55	0,211	0,174	0,192	1,527	1,318	1,173
56	0,266	0,223	0,245	1,941	1,675	1,491
57	0,222	0,219	0,220	1,749	1,509	1,344
58	0,226	0,199	0,212	1,685	1,454	1,295
59	0,235	0,225	0,230	1,824	1,574	1,401
60	0,540	0,593	0,566	4,493	3,878	3,452
61	0,307	0,247	0,277	2,197	1,896	1,688
62	0,218	0,216	0,217	1,722	1,486	1,323
63	0,378	0,318	0,348	2,762	2,384	2,122
64	0,343	0,360	0,351	2,789	2,407	2,143
65	0,261	0,239	0,250	1,984	1,712	1,524
66	0,143	0,117	0,130	1,034	0,892	0,794
67	0,338	0,326	0,332	2,635	2,274	2,024
68	0,234	0,203	0,218	1,732	1,495	1,331
69	0,251	0,266	0,259	2,053	1,772	1,577
70	0,183	0,152	0,167	1,329	1,147	1,021
71	0,229	0,215	0,222	1,762	1,520	1,353
72	0,296	0,266	0,281	2,230	1,924	1,713
73	0,298	0,310	0,304	2,413	2,083	1,854
74	0,265	0,262	0,264	2,092	1,806	1,608
75	0,368	0,336	0,352	2,792	2,410	2,145
76	0,181	0,197	0,189	1,500	1,295	1,153

Resultado de teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos criados em sistema semi-intensivo obtidos em um abatedouro no Norte do Paraná, Brasil. 2017. Leitura considerada como a Média da DO (densidade ótica) + 4 DP (desvio padrão) do cut-off. Resultados acima de 1 foram considerados positivos.

continua

Amostra	DO1	DO2	Média	Média + 2DP (0,126)	Média + 3DP (0,146)	Média + 4DP (0,165)
77	0,298	0,267	0,283	2,242	1,935	1,723
78	0,216	0,200	0,208	1,651	1,425	1,269
79	0,357	0,337	0,347	2,753	2,376	2,115
80	0,148	0,151	0,150	1,187	1,024	0,912
81	0,477	0,453	0,465	3,690	3,184	2,835
82	0,219	0,227	0,223	1,769	1,527	1,359
83	0,255	0,242	0,248	1,971	1,701	1,514
84	0,203	0,212	0,208	1,649	1,423	1,267
85	0,189	0,197	0,193	1,533	1,323	1,177
86	0,221	0,225	0,223	1,771	1,528	1,360
87	0,250	0,275	0,262	2,082	1,797	1,600
88	0,292	0,284	0,288	2,287	1,974	1,757
89	0,238	0,241	0,240	1,903	1,642	1,462
90	0,236	0,249	0,242	1,922	1,659	1,477
91	0,391	0,443	0,417	3,307	2,854	2,541
92	0,225	0,221	0,223	1,773	1,530	1,362
93	0,289	0,284	0,287	2,275	1,963	1,748
94	0,219	0,212	0,215	1,706	1,473	1,311
95	0,236	0,227	0,231	1,835	1,583	1,409
96	0,292	0,286	0,289	2,291	1,977	1,760
97	0,265	0,251	0,258	2,044	1,764	1,571
98	0,101	0,101	0,101	0,800	0,691	0,615
99	0,173	0,191	0,182	1,443	1,245	1,109
100	0,190	0,193	0,192	1,520	1,312	1,168
101	0,160	0,166	0,163	1,293	1,116	0,994
102	0,337	0,360	0,348	2,764	2,385	2,123
103	0,107	0,126	0,116	0,921	0,795	0,708
104	0,082	0,087	0,084	0,669	0,577	0,514
105	0,080	0,086	0,083	0,659	0,569	0,506
106	0,086	0,098	0,092	0,731	0,630	0,561
107	0,171	0,168	0,170	1,345	1,161	1,034
108	0,169	0,193	0,181	1,436	1,239	1,103
109	0,202	0,201	0,201	1,598	1,379	1,228
110	0,145	0,170	0,158	1,250	1,079	0,961
111	0,103	0,115	0,109	0,864	0,746	0,664

Resultado de teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos criados em sistema semi-intensivo obtidos em um abatedouro no Norte do Paraná, Brasil. 2017. Leitura considerada como a Média da DO (densidade ótica) + 4 DP (desvio padrão) do cut-off. Resultados acima de 1 foram considerados positivos.

continua

Amostra	DO1	DO2	Média	Média + 2DP (0,126)	Média + 3DP (0,146)	Média + 4DP (0,165)
112	0,193	0,204	0,199	1,576	1,360	1,211
113	0,237	0,287	0,262	2,079	1,795	1,598
114	0,148	0,162	0,155	1,229	1,061	0,944
115	0,174	0,184	0,179	1,419	1,224	1,090
116	0,105	0,108	0,106	0,845	0,729	0,649
117	0,297	0,312	0,305	2,418	2,087	1,858
118	0,094	0,097	0,095	0,756	0,653	0,581
119	0,150	0,144	0,147	1,165	1,006	0,895
120	0,174	0,176	0,175	1,389	1,199	1,067
121	0,204	0,215	0,209	1,661	1,434	1,276
122	0,352	0,324	0,338	2,680	2,313	2,059
123	0,184	0,178	0,181	1,435	1,238	1,102
124	0,159	0,135	0,147	1,166	1,007	0,896
125	0,151	0,179	0,165	1,310	1,130	1,006
126	0,122	0,115	0,119	0,942	0,813	0,724
127	0,108	0,089	0,098	0,781	0,674	0,600
128	0,156	0,139	0,147	1,169	1,009	0,898
129	0,214	0,245	0,230	1,822	1,573	1,400
130	0,153	0,142	0,147	1,170	1,010	0,899
131	0,209	0,227	0,218	1,728	1,491	1,328
132	0,094	0,098	0,096	0,759	0,655	0,583
133	0,139	0,164	0,151	1,200	1,036	0,922
134	0,082	0,087	0,084	0,670	0,578	0,515
135	0,147	0,142	0,144	1,145	0,988	0,880
136	0,130	0,138	0,134	1,062	0,916	0,816
137	0,135	0,139	0,137	1,087	0,938	0,835
138	0,226	0,222	0,224	1,774	1,531	1,363
139	0,227	0,226	0,226	1,796	1,550	1,380
140	0,158	0,234	0,196	1,556	1,343	1,196
141	0,121	0,130	0,125	0,994	0,858	0,764
142	0,121	0,152	0,136	1,081	0,933	0,831
143	0,143	0,171	0,157	1,244	1,074	0,956
144	0,202	0,213	0,208	1,648	1,423	1,266
145	0,135	0,144	0,139	1,106	0,954	0,849
146	0,140	0,155	0,148	1,171	1,010	0,899
147	0,126	0,123	0,124	0,985	0,850	0,757

Resultado de teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos criados em sistema semi-intensivo obtidos em um abatedouro no Norte do Paraná, Brasil. 2017. Leitura considerada como a Média da DO (densidade ótica) + 4 DP (desvio padrão) do cut-off. Resultados acima de 1 foram considerados positivos.

continua

Amostra	DO1	DO2	Média	Média + 2DP (0,126)	Média + 3DP (0,146)	Média + 4DP (0,165)
148	0,209	0,213	0,211	1,676	1,446	1,288
149	0,140	0,143	0,141	1,122	0,968	0,862
150	0,064	0,052	0,058	0,461	0,398	0,354
151	0,111	0,114	0,112	0,891	0,769	0,685
152	0,164	0,164	0,164	1,300	1,122	0,999
153	0,112	0,120	0,116	0,922	0,796	0,709
154	0,151	0,142	0,146	1,162	1,003	0,893
155	0,147	0,139	0,143	1,134	0,979	0,871
156	0,124	0,124	0,124	0,987	0,852	0,758
157	0,157	0,149	0,153	1,214	1,048	0,933
158	0,101	0,094	0,098	0,774	0,668	0,595
159	0,179	0,184	0,181	1,439	1,242	1,105
160	0,263	0,273	0,268	2,127	1,836	1,634
161	0,248	0,228	0,238	1,892	1,633	1,454
162	0,112	0,120	0,116	0,920	0,794	0,707
163	0,105	0,103	0,104	0,825	0,712	0,634
164	0,139	0,139	0,139	1,101	0,950	0,846
165	0,100	0,101	0,100	0,794	0,685	0,610
166	0,223	0,215	0,219	1,741	1,503	1,338
167	0,180	0,163	0,171	1,359	1,173	1,044
168	0,116	0,140	0,128	1,014	0,875	0,779
169	0,177	0,235	0,206	1,633	1,409	1,255
170	0,251	0,200	0,225	1,789	1,544	1,375
171	0,221	0,183	0,202	1,601	1,382	1,230
172	0,099	0,101	0,100	0,793	0,685	0,609
173	0,155	0,123	0,139	1,104	0,952	0,848
174	0,130	0,109	0,119	0,948	0,818	0,728
175	0,109	0,120	0,114	0,906	0,782	0,696
176	0,192	0,190	0,191	1,517	1,309	1,166
177	0,145	0,164	0,155	1,228	1,060	0,944
178	0,035	0,027	0,031	0,245	0,211	0,188
179	0,119	0,128	0,123	0,978	0,844	0,752
180	0,268	0,280	0,274	2,174	1,876	1,670
181	0,132	0,131	0,132	1,044	0,901	0,802
182	0,085	0,110	0,098	0,776	0,670	0,596
183	0,127	0,110	0,119	0,941	0,812	0,723

Resultado de teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em frangos criados em sistema semi-intensivo obtidos em um abatedouro no Norte do Paraná, Brasil. 2017. Leitura considerada como a Média da DO (densidade ótica) + 4 DP (desvio padrão) do cut-off. Resultados acima de 1 foram considerados positivos.

conclusão

Amostra	DO1	DO2	Média	Média + 2DP (0,126)	Média + 3DP (0,146)	Média + 4DP (0,165)
184	0,115	0,082	0,099	0,782	0,675	0,601
185	0,150	0,148	0,149	1,179	1,017	0,905
186	0,217	0,195	0,206	1,635	1,411	1,256
187	0,251	0,194	0,223	1,766	1,524	1,357
188	0,100	0,109	0,105	0,831	0,717	0,638
189	0,122	0,129	0,126	0,997	0,860	0,766
190	0,206	0,199	0,202	1,606	1,386	1,234