

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE FRANGOS COM *Toxocara canis*: CINÉTICA E
AVIDEZ DE ANTICORPOS IgY**

RICARDO DA SILVA RAPOSO

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE FRANGOS COM *Toxocara canis*: CINÉTICA E
AVIDEZ DE ANTICORPOS IgY

RICARDO DA SILVA RAPOSO

Dissertação apresentada a 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

636.513
S586i

Silva Raposo, Ricardo.

Infecção experimental de frangos com *Toxocara canis*: cinética e avidéz de anticorpos IgY / Ricardo da Silva Raposo. – Presidente Prudente, 2014.
46 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Vamilton Alvares Santarém.

1. Frango de corte. 2. Aves. 3. *Toxocara canis*
4. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. I. Título.

RICARDO DA SILVA RAPOSO

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE FRANGOS COM *Toxocara canis*: CINÉTICA
E AVIDEZ DE ANTICORPOS IgY**

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, 09 de dezembro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste

Prof. Dra. Lisiane de Almeida Martins
Universidade Paranaense - UNIPAR
Umuarama - PR

Prof. Dr. Rogério Giuffrida
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial à minha mãe Tereza Marta e ao meu pai Valdemar, que são as pessoas mais importantes da minha vida e que sempre me proporcionaram um suporte necessário para alcançar meus objetivos.

Aos meus queridos amigos, pelo companheirismo e amizade ao longo de todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida e por me conceder saúde e sabedoria para escolher esta profissão, a qual amo e tento me dedicar ao máximo possível pelo bem-estar dos animais e dos seres humanos.

Ao meu orientador, o querido Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém, os meus sinceros agradecimentos não apenas por sua orientação sábia e dedicada, mas também pelo incentivo, confiança e amizade desde o momento em que o conheci.

À querida Prof^ª. Dra. Cecília Laposy, pela amizade, contribuição de forma muito prestativa durante todo o período experimental e pela gentileza em permitir o uso do Laboratório de Patologia Clínica da Unoeste.

À querida Prof^ª. Dra. Guita Rubinsky-Elefant, por me receber muitíssimo bem no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, além da sua enorme paciência e contribuição nas análises sorológicas do trabalho.

Ao querido Prof. Aristeu Vieira da Silva, por sua excepcional contribuição para as análises estatísticas, resultados e discussões do trabalho.

À Ana Maria Siqueira Wehbe e Sidenir Aparecida Braz Cortez, pela colaboração em diversos momentos durante o processamento das amostras no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Unoeste.

A todos os colaboradores do experimento, em especial aos alunos da graduação de Medicina Veterinária da Unoeste, Yslla Fernanda Fitz Balo Merigueti, Bianca Pelegi Zampieri, Letícia Maria de Lima Cerazo, Ludimila Pereira e Jhony Gilio, por todo o tempo de trabalho e dedicação durante o período experimental.

A todos os professores da Pós-Graduação da Unoeste, pelos conhecimentos transmitidos durante as aulas.

A todos os funcionários da Unoeste que tiveram alguma participação para a realização do experimento, em especial à Prof^a. Ana Cláudia Ambiel, pela autorização do espaço para realização do experimento; ao Prof. Paulo Claudeir Gomes da Silva e a Prof^a. Dra. Lilian Francisco Arantes de Souza; aos funcionários do Centro Zootécnico da Unoeste; e aos funcionários Lucas batista dos Santos e Willian Everson Ramos da Costa, do Biotério da Unoeste, pelo extraordinário auxílio durante todo o período experimental.

A todos os amigos e colegas que fiz na Pós-Graduação, por compartilharem momentos de muita alegria e companheirismo durante esses quase dois anos.

À UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista, pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação e por toda estrutura oferecida para o pleno desenvolvimento do experimento e da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Mestrado PROSUP.

Os meus sinceros agradecimentos!

*“A felicidade não está na estrada que leva a algum lugar.
A felicidade é a própria estrada que nós percorremos.”
(Bob Dylan)*

RESUMO

Infecção experimental de frangos com *Toxocara canis*: cinética e avides de anticorpos IgY

A toxocaríase é uma geozoonose de distribuição mundial provocada principalmente pela ingestão de ovos embrionados de nematódeos do gênero *Toxocara*. A doença também pode ser transmitida ao homem pela ingestão de carne crua ou mal cozida de hospedeiros paratênicos, como aves. Estudos sobre resposta humoral de anticorpos em aves, porém, são escassos na literatura. O objetivo do estudo foi avaliar a produção de IgY (IgG) em frangos infectados experimentalmente com *Toxocara canis*. Três grupos (n=12 por grupo) de frangos de corte da linhagem Cobb (G1, G2 e G3), fêmeas, com 34 dias de idade, foram infectados, por via oral (gavagem), com 100, 1000 e 5000 ovos embrionados de *T. canis*, respectivamente. Outro grupo não infectado (G4; n=12) foi avaliado como controle. Amostras de sangue foram obtidas nos momentos 0 (pré-infecção), 7, 14, 21, 28, 45 e 60 dias pós-infecção (DPI), para obtenção de soro. Foi realizada a padronização do ensaio imunoenzimático ELISA indireto, utilizando-se antígenos de excreção e secreção (TES) de larvas de *T. canis* e conjugado anti-IgY de frango marcado com peroxidase, bem como avaliado o índice de avides (IA) destes anticorpos. Uma Curva ROC foi obtida para todos os momentos, e outras para a fase inicial ou aguda (7 a 21 DPI) e fase final ou crônica (28 a 60 DPI). O ponto de corte foi de 0,368, e o teste apresentou 91,7% de sensibilidade (IC 95%: 77,5-98,2) e 100% de especificidade (IC 95%: 92,6-100). A eficiência foi de 97,0% aos 60 DPI. Em relação à cinética de anticorpos, a soroconversão das aves do G2 e G3 ocorreu antes (21 DPI) daquelas do G1 (28 DPI). Os Índices de Avides foram médios aos 21 DPI, passando a altos valores após 28 DPI, indicando uma fase crônica da infecção. Os resultados do estudo mostram que o teste de ELISA pode ser uma ferramenta de alta eficiência para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* em aves, servindo tanto para estudos seroepidemiológicos como para avaliar o papel das aves como marcadores de contaminação ambiental por ovos de *Toxocara* spp.

Palavras-chave: Aves, Resposta imune, ELISA, Toxocaríase.

ABSTRACT

Experimental infection of chickens with *Toxocara canis*: kinetic and avidity of IgY antibodies

Toxocariasis is a geohelminth zoonosis with worldwide distribution, mainly through the ingestion of embryonated eggs of nematodes of the *Toxocara* genus. The disease can also be transmitted to humans as a result of eating raw or undercooked meat of parathenic hosts, such as birds. Studies on the humoral immune response through antibodies in chickens, however, are scarce. The aim of this study was to evaluate the production of IgY (IgG) in broiler chickens experimentally infected with *Toxocara canis*. Three groups (n=12 per group) of female broiler chickens (G1, G2 and G3), 34 days of age, were infected orally (gavage), with 100, 1000 and 5000 *T. canis* eggs, respectively. Another, non-infected group (G4, n=12), was assessed as the control. Blood samples were obtained at the following time points: 0 (pre-infection), 7, 14, 21, 28, 45 and 60 days post-infection (DPI). Kinetic and avidity index (AI) of IgY were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed for each time point, and subsequently analyzed to differentiate the initial or acute phase (7 to 21 DPI) and the final or chronic stage (28 to 60 DPI). The cutoff point was 0.368, and the test showed 91.7% sensitivity (CI 95%: 77.5-98.3) and 100% specificity (CI 95%: 92.6-100). The highest efficiency (97.0%) was observed at 60 DPI. Regarding the kinetics of antibodies, the seroconversion of the birds in the G2 and G3 groups occurred before (21 DPI) those in the G1 (28 DPI). The AI was medium at 21 DPI, becoming high after 28 DPI, indicating a chronic phase of infection. The results of the study demonstrate that the ELISA test could be a highly efficient tool for the detection of anti-*Toxocara* antibodies in birds, serving both for seroepidemiological studies and to evaluate the role of chickens as indicators of environmental contamination of *Toxocara* spp.

Key words: Poultry, Immune response, ELISA, Toxocariasis.

LISTA DE SIGLAS

AUC – Area under the curve (Área sob a curva)

BSA – Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DPI – Dias pós-infecção

DO – Densidade Ótica

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

IA – Índice de Avidéz

IC – Intervalo de Confiança

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IgY – Imunoglobulina Y

IMTSP – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

IR – Índice de Reatividade

PBS – Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)

PBS-T – Phosphate buffered saline com Tween-20

PMSF – Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoreto de fenilmetilsulfonil)

ROC – Receiver Operating Characteristic (característica de operação de receptor)

RPM – Rotações por minuto

TES – Antígenos de Excreção-secreção

UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista

USDA – United States Department of Agriculture

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

% – Por cento

μL – Microlitro

μm – Micrometro

CO₂ – Dióxido de Carbono

g – grama

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

Kg – Quilograma

M – Molar

m² – Metro quadrado

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milimetro

N – Normal

NaCl – Cloreto de sódio (Solução fisiológica)

nm – Nanômetro

pH – Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------|----|
| 1 ARTIGO CIENTÍFICO..... | 13 |
| ANEXOS | 40 |

1 ARTIGO CIENTÍFICO*

Experimental infection of chickens with *Toxocara canis*: kinetic and avidity of IgY antibodies

Infecção experimental de frangos com *Toxocara canis*: cinética e avidéz de anticorpos IgY

Ricardo da Silva Raposo¹, Bianca Pelegi Zampieri², Letícia Maria de Lima Cerazo², Ludimilla Pereira², Yslla Fernanda Fitz Balo Meriguetti², Guita Rubinsky-Elefant³, Aristeu Vieira da Silva⁴, Cecília Braga Laposy¹, Vamilton Alvares Santarém¹⁺

¹ Mestrado em Ciência Animal. Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Presidente Prudente, São Paulo.

² Graduação em Medicina Veterinária, Unoeste, Presidente Prudente, São Paulo.

³ Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia. Universidade de São Paulo - USP, São Paulo.

⁴ Mestrado em Zoologia. Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS, Feira de Santana, Bahia.

* Normas da Veterinary Parasitology. (<http://www.journals.elsevier.com/veterinary-parasitology/>)

+ Autor para correspondência:

Mestrado em Ciência Animal. Universidade do Oeste Paulista. Rodovia Raposo Tavares Km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Tel./Fax: 55 18 3229 2077. E-mail: vamilton@unoeste.br

Experimental infection of chickens with *Toxocara canis*: kinetic and avidity of IgY antibodies

Abstract

Toxocariasis is a geohelminth zoonosis with worldwide distribution, mainly through the ingestion of embryonated eggs of nematodes of the *Toxocara* genus. The disease can also be transmitted to humans as a result of eating raw or undercooked meat of parathenic hosts, such as birds. Studies on the humoral immune response through antibodies in chickens, however, are scarce. The aim of this study was to evaluate the production of IgY (IgG) in broiler chickens experimentally infected with *Toxocara canis*. Three groups (n=12 per group) of female broiler chickens (G1, G2 and G3), 34 days of age, were infected orally (gavage), with 100, 1000 and 5000 *T. canis* eggs, respectively. Another, non-infected group (G4, n=12), was assessed as the control. Blood samples were obtained at the following time points: 0 (pre-infection), 7, 14, 21, 28, 45 and 60 days post-infection (DPI). Kinetic and avidity index (AI) of IgY were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed for each time point, and subsequently analyzed to differentiate the initial or acute phase (7 to 21 DPI) and the final or chronic stage (28 to 60 DPI). The cutoff point was 0.368, and the test showed 91.7% sensitivity (CI 95%: 77.5-98.3) and 100% specificity (CI 95%: 92.6-100). The highest efficiency (97.0%) was observed at 60 DPI. Regarding the kinetics of antibodies, the seroconversion of the birds in the G2 and G3 groups occurred before (21 DPI) those in the G1 (28 DPI). The AI was medium at 21 DPI, becoming high after 28 DPI, indicating a chronic phase of infection. The results of the study demonstrate that the ELISA test could be a highly efficient tool for the detection of anti-*Toxocara* antibodies in birds, serving both for seroepidemiological studies and to evaluate the role of chickens as indicators of environmental contamination of *Toxocara* spp.

Key Words: Poultry, immune response, ELISA, toxocariasis.

1. Introdução

O aumento do consumo de alimentos saudáveis, isentos de resíduos químicos, e o bem-estar animal têm estimulado mundialmente a produção de frangos ecológicos (Figueiredo, 2014). Estima-se um crescimento de 30% ao ano do mercado internacional de carne de aves criadas nesse sistema (Figueiredo, 2014). Esse crescimento foi registrado no Reino Unido (Hickman, 2008), Estados Unidos (USDA, 2014) e Brasil (Murakami, 2012).

Apesar da excelente qualidade da carne de frangos criados em sistema semi-intensivo ou extensivo, a criação de aves em áreas com a presença de cães e gatos aumenta o risco de infecção por geohelmintos, que podem ser transmitidos pelo consumo de carne crua ou mal cozida, como é o caso da toxocaríase, uma geozoonose de distribuição mundial (Cardozo e Yamamura, 2004; Taira et al., 2004; Moreira et al., 2014). A Toxocaríase é ocasionada por nematódeos do gênero *Toxocara* spp., especialmente *Toxocara canis* e *Toxocara cati* (Magnaval et al., 2001; Alvarado-Esquivel, 2013), parasitos que tem o cão e o gato, respectivamente, como hospedeiros definitivos, nos quais completam o ciclo no intestino delgado (Despommier, 2003).

O homem atua como hospedeiro paratênico de *Toxocara* spp. (Strube et al., 2013). O parasito não completa o ciclo no ser humano, mas as larvas oriundas da eclosão de ovos ingeridos atravessam a parede intestinal e migram pela circulação para diversos órgãos. A toxocaríase pode ser assintomática ou levar ao surgimento de problemas em diversos órgãos, a larva *migrans* visceral (Beaver et al., 1952); no sistema oftálmico, a larva *migrans* ocular (Zinkham, 1978); ou no sistema nervoso central, a neurotoxocaríase (Finsterer e Auer, 2007).

A toxocaríase tende a ser mais prevalente em regiões tropicais (Rubinsky-Elefant et al., 2010), mas tem sido descrita como a mais importante helmintose em países industrializados (Magnaval et al., 2001). Estudos seroepidemiológicos mostram que a prevalência de anticorpos anti-*Toxocara* nos Estados Unidos, México e algumas regiões do Canadá é superior a 10% (Lee et al., 2014). Na África, a soroprevalência foi de 92,8% (Magnaval et al., 1994).

Casos de toxocaríase humana associados ao consumo de carne e víscera crua ou mal cozida de frangos têm sido descritos (Nagakura et al., 1989; Morimatsu et al., 2006). Estudos experimentais com *Toxocara* spp. em aves têm sido realizados, para avaliação do comportamento migratório, infectividade e recuperação de larvas em tecidos (Galvin, 1964; Pahari e Sasmal, 1990; Taira et al., 2003b; Azizi et al., 2007; Dutra et al., 2014). Contudo, dados sobre a avaliação da resposta imune humoral nessa espécie são escassos na literatura.

Dessa forma, a detecção de anticorpos anti-*Toxocara* em frangos pode fornecer informações para estudos seroepidemiológicos e para avaliar o papel das aves como marcadores de contaminação ambiental por ovos de *Toxocara* spp.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e a avidéz de anticorpos (IgY), em frangos de corte infectados experimentalmente com diferentes doses de ovos de *T. canis*.

2. Material e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (Protocolo nº 1677) e os procedimentos de infecção e eutanásia fundamentados na Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Brasil, 2012).

2.1. Obtenção de ovos de *Toxocara canis*

Fêmeas adultas de *T. canis* foram obtidas de filhotes de cães infectados naturalmente, mantidos no Canil da Unoeste, que excretaram espontaneamente parasitos adultos após tratamento com piperazina (100mg/kg). Para obtenção dos ovos, foi seguido o procedimento descrito por Pecinali et al. (2005), com modificações. Os ovos foram extraídos diretamente do oviduto de fêmeas adultas de *T. canis*, e posteriormente mantidos em solução de formalina 2%, por 3 a 4 semanas, em estufa com controle de temperatura ($\pm 37^{\circ}\text{C}$), para embrionamento e desenvolvimento larval. Após este período, o material foi lavado por três vezes em solução fisiológica, por centrifugação a 2000 rpm, por 3 minutos.

Doses infectantes de 100, 1000 e 5000 ovos embrionados foram obtidas para realização da infecção experimental. A contagem foi efetuada em câmara de Neubauer e os ovos diluídos em 1,0 mL de solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2. (PBS).

2.2. Animais

O experimento foi conduzido no aviário do Centro Zootécnico da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo. Foram utilizados 48 frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*), fêmeas, da linhagem Cobb. As aves foram obtidas de um incubatório de aves comercial (GLOBOAVES – Itirapina-SP) com certificação HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), um programa padrão em excelência na garantia da qualidade sanitária dos produtos.

As baias utilizadas para a realização do experimento foram previamente desinfetadas por flambagem com auxílio de vassoura de fogo e posteriormente abastecidas com cama de maravalha autoclavada (Autoclave Lufenco 39224).

As aves foram identificadas individualmente com anilhas “tipo Placas” para asa aos 14 dias de idade, e passaram por um período de 20 dias para aclimatação, recebendo ração comercial de fase de crescimento e água *ad libitum*.

As aves foram alocadas em densidade populacional de 3 frangos/m², inferior aos 13 a 18 frangos/m² preconizados pela Embrapa (2007) para criações confinadas.

A limpeza e o arraçoamento das aves foram realizados diariamente. O manejo sanitário incluiu práticas de biossegurança na avicultura (Embrapa, 2007) e imunização das aves contra as Doenças de Marek (1 dia de vida), Gumboro (1, 7, 21 e 56 dias) e Newcastle (7, 21 e 56 dias).

Exames coproparasitológicos, utilizando a técnica de flutuação e de centrífugo-sedimentação (Bowman, 2009), foram realizados semanalmente durante o período de adaptação das aves para assegurar a ausência de coccídeos e helmintos.

2.3. Infecção Experimental

Para avaliação da infectividade dos ovos utilizados para infecção dos frangos, foi realizado preliminarmente um bioensaio em quatro camundongos, com uma dose única de 1000 ovos. Após 72 horas, esses animais foram eutanasiados em Câmara de CO₂, os fígados foram extraídos e submetidos à técnica de Baermann modificada para recuperação de larvas (Chieffi et al., 1995; Taira et al., 2003b).

Foram formados, por sorteio, quatro grupos experimentais com 12 aves em cada grupo, infectados com 100 (G1), 1000 (G2) e 5000 (G3) ovos diluídos em 1,0 mL de PBS, por gavagem. Um grupo controle (G4) recebeu, pela mesma via, 1,0 mL de PBS isento de ovos. A infecção das aves foi realizada aos 34 dias de vida.

2.4. Colheita das Amostras

Amostras de sangue de aproximadamente 2,0 mL foram colhidas a partir da punção da veia braquial das aves, com auxílio de agulhas 25x7 mm e seringas descartáveis, e armazenadas em tubos de ensaio estéreis sem anticoagulante.

As amostras obtidas foram centrifugadas a 3000 rpm ($g = 1257$) durante 10 minutos, para obtenção dos soros, que foram armazenados a -30°C até o momento do processamento. As colheitas foram realizadas no momento 0, pré-infecção, e após 7, 14, 21, 28, 45 e 60 dias pós infecção (DPI).

2.5. Produção do Antígeno de Excreção e Secreção de Larvas de *Toxocara canis* (TES)

O preparo do antígeno foi baseado no método descrito por De Savigny (1975), com modificações (Elefant et al., 2006).

Exemplares adultos de *Toxocara canis* foram obtidos do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura do Município de São Paulo. Os ovos de *T. canis* foram obtidos por dissecação do útero das fêmeas, mantidos em solução de formalina a 2%, por no mínimo 28 dias, para o embrionamento dos ovos, que após este período, foram lavados com solução fisiológica (NaCl 0,85%), por centrifugação a 3000 g, por 3 minutos. Em seguida foram ressuspensos em solução de hipoclorito de sódio a 5%, por aproximadamente 5 minutos, em temperatura ambiente, para a remoção das camadas proteica e quitinosa da membrana, processo esse acompanhado ao microscópio óptico, e lavados por centrifugação a 3.000 g, por 3 minutos, com solução fisiológica até a completa remoção da solução do hipoclorito. A seguir, os ovos foram ressuspensos em meio de Eagle (meio mínimo essencial) contendo gentamicina (80 $\mu\text{g/mL}$) e transferidos assepticamente para um *Erlenmeyer* contendo pérolas de vidro, para auxiliarem no rompimento dos ovos e liberação das larvas.

Ao final, transferiu-se a suspensão para um funil de Baermann modificado e as larvas, após migrarem por geotropismo e termotropismo, foram coletadas sob condições estéreis em tubos de ensaio e mantidas em estufa a 37°C.

Semanalmente, coletou-se o sobrenadante e acrescentou-se nova alíquota de meio Eagle aos tubos contendo as larvas. Nestas condições, as larvas puderam permanecer metabolicamente ativas por vários meses. Ao meio coletado, contendo produtos de excreção e secreção das larvas, adicionou-se inibidor de proteases PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonil-1; mM-Sigma) e preservou-se em alíquotas, a -20°C. Posteriormente, a mistura de diversas partidas de sobrenadante foi concentrada de 50 a 100 vezes (aparelho Amicon, membrana YM10), dialisada contra água destilada, centrifugada a 18.500 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore de 0,22 µm, efetuou-se a dosagem proteica pelo método de Lowry (1951), novamente acrescentou-se inibidor de protease PMSF e foi preservado em alíquotas a -20°C até o momento do uso.

2.6. Teste Imunoenzimático (ELISA)

O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto foi padronizado para avaliar a produção de anticorpos IgY (IgG) anti-*Toxocara*, de acordo com protocolo descrito por De Savigny et al. (1979), com modificações (Taira et al., 2003a; Elefant et al., 2006), utilizando-se antígenos de excreção e secreção de larvas de *T. canis* (TES) (De Savigny, 1975; Elefant et al., 2006).

Para realização do teste, microplacas de poliestireno de 96 poços (Corning-Incorporated Costar, New York, EUA) foram sensibilizadas (100µL/poço) com antígenos TES (1,9 µg/mL em PBS), durante 2 horas a 37°C, e posteriormente por 18 horas a 4°C.

Em seguida, as placas foram submetidas a três lavagens durante 5 minutos com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). As microplacas foram bloqueadas (200 $\mu\text{L}/\text{poço}$) com solução de albumina de soro bovino (BSA, Sigma, St. Louis, EUA) a 1,0% em PBS-T, por 1 hora a 37°C e lavadas por três vezes com PBS-T.

Foi realizada uma padronização com diferentes diluições dos soros (a partir de 1/50 até 1/6400, na razão 2) e de conjugado (1/5.000, 1/10.000, 1/15.000, 1/20.000, 1/30.000 e 1/40.000), tendo sido escolhidas as seguintes condições: soros foram diluídos a 1/200 e realizada incubação em duplicata, 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$, por 40 minutos a 37°C. Após novo ciclo de lavagens, as placas foram incubadas com conjugado anti-IgY (IgG) de frango marcado com peroxidase, produzido em coelhos, 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$, (A-9046 Sigma-Birmingham, AL, EUA) diluído a 1/40.000 em PBS-T, por 40 minutos a 37°C, seguido de nova lavagem tripla. Em seguida, acrescentou-se a solução cromógena de tetra-metil-benzidina (BD[®], San Diego, Califórnia, EUA), 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$, e incubou-se por 6 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N (50 $\mu\text{L}/\text{poço}$). A leitura das densidades ópticas (DO) foi realizada em comprimento de onda de 450 nm, em leitor de ELISA (Titertek Multiskan MCC/340, Lab-System, Finlândia). Em todas as placas foram acrescentados *pool* de soros de aves infectadas, como controle positivo e *pool* de soros de aves não infectadas, como controle não reagente.

O ponto de corte (“*cut-off*”) foi definido pela curva de Características de Operação do Receptor (ROC - Receiver Operating Characteristics) com emprego do software GraphPad Prism[®] (Versão 5), baseada em 48 amostras de soro de aves pré-infecção e 36 soros das aves infectadas, colhidas aos 45 DPI.

Os níveis de anticorpos foram expressos em índices de reatividade (IR), calculados como a razão entre o valor de cada amostra testada e o valor da DO do *cut-*

off ($IR = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut-off}$). As amostras que apresentaram IR acima de 1,0 foram consideradas positivas.

2.7. *Avidez de anticorpos IgY*

Para o estudo da avidéz, foi empregado o método da dissociação, com o uso de ureia como agente desnaturante (Hedman et al., 1989) a uma concentração de 8 M.

Anteriormente ao ensaio, a placa de ELISA sensibilizada e bloqueada foi tratada por 5 minutos com ureia para avaliar a possibilidade de o agente desnaturante agir sobre o antígeno adsorvido à fase sólida e interferir nos resultados. Após incubação das amostras dos soros em duplicata, a primeira lavagem de uma das duplicatas foi realizada com solução de ureia 8 M por 5 minutos.

O índice de avidéz (IA) foi calculado pela relação da DO da amostra tratada com ureia pela DO da amostra sem o tratamento com ureia, multiplicado por 100 [$IA = (DO \text{ com ureia} / DO \text{ sem ureia}) \times 100$]. A classificação do IA seguiu os critérios preconizados por Hedman e Rousseau (1989): IA menor que 30%, representa predomínio de anticorpos de baixa avidéz; IA com valor entre 30 e 50%, predomínio de anticorpos de média avidéz; e IA acima de 50%, predomínio de anticorpos de alta avidéz.

2.8. *Análise Estatística*

As estimativas de sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falso-positivos, falso-negativos e o índice de associação kappa foram calculados nos diferentes momentos (Mackinnon, 2000).

Uma Curva ROC foi obtida para todos os momentos, e outras para os momentos de 7 a 21 (fase inicial da infecção experimental) e de 28 a 60 DPI (fase final da infecção

experimental), com cálculo da área sobre a curva (AUC) e as estimativas de sensibilidade e especificidade, considerando-se diferentes pontos de corte.

As médias dos índices de reatividade (IR) de IgY detectadas pelo ELISA foram comparadas entre grupos em um mesmo momento, e entre os momentos para um mesmo grupo, pela Análise de Variância em uma via (ANOVA *one-way*) com contrastes pelo teste de Tukey e Bonferroni, respectivamente. A correlação entre IR e IA foi verificada pelo cálculo do coeficiente de correlação de Pearson.

A comparação estatística foi realizada com o emprego do Software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007). Foram considerados como significativos, os valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

O *cut-off* definido para o teste de ELISA para a detecção de anticorpos IgY anti-*Toxocara* nos soros dos frangos resultou em 0,368. A sensibilidade foi de 91,7% (IC 95%: 77,5% a 98,2%) e a especificidade de 100,0% (IC 95%: 92,6% a 100%).

Na Tabela 1, são expressas a sensibilidade, especificidade e eficiência do ELISA, a partir de 7 DPI. De acordo com os resultados e com base na curva ROC (Fig. 1), a sensibilidade do teste foi baixa (<50,0%) nas primeiras três semanas PI, e elevou-se com o transcorrer do período pós-infecção. A especificidade do teste, por sua vez, foi superior a 90% em todos os momentos avaliados. A melhor eficiência (97,0%) foi observada aos 60 DPI, com valores de sensibilidade e especificidade de 96,8% e 100%, respectivamente.

Em relação à média dos IR (Tabela 2), a soroconversão foi verificada a partir dos 21 dias nos grupos infectados com 1000 e 5000 ovos, enquanto nas aves que receberam 100 ovos, os anticorpos foram detectados a partir de 28 dias, com aumento

gradativo de IR até 45 DPI. Aos 45 DPI, foi observado que os IR médios dos G2 e G3 foram significativamente superiores aos dos animais do G1.

Na avaliação da avidéz (Tabela 3), foi verificada a predominância de anticorpos com médio IA aos 21 DPI no G2 e G3. A partir dos 28 DPI, os anticorpos apresentaram alto IA em todos os grupos experimentais, que se manteve até o final do estudo.

Foi observada correlação entre IR e IA aos 28 e 60 DPI nas aves infectadas com 5000 ovos, e aos 60 DPI naquelas que receberam 1000 ovos (Tabela 4).

Quando as análises de IR e IA incluíram todos os animais infectados, independentemente do número de ovos, foi observado um aumento significativo na média (Fig. 2) e correlação significativa ($p < 0,05$) entre os índices (Fig. 3), quando comparados os três primeiros momentos de infecção (7 a 21 DPI) com os três últimos (28 a 60 DPI).

Durante o estudo, não foram observadas alterações clínicas ou comportamentais nas aves infectadas e no grupo controle.

4. Discussão

No presente estudo, a cinética e a avidéz de anticorpos foram avaliadas a partir da padronização de ELISA indireto, para detecção de IgY anti-*Toxocara* em frangos infectados com diferentes doses de ovos embrionados de *T. canis*.

De acordo com os resultados, o teste mostrou uma baixa eficiência na fase inicial da infecção, que pode ser consequência da ausência de IgY nos primeiros dias PI (resposta primária ao antígeno), caracterizada pela produção de IgM (Munhoz et al., 2014). Aos 28 DPI, a sensibilidade e a especificidade do teste foram próximas daquelas preconizadas para o ELISA em humanos, de 78% e 92%, respectivamente (Glickman et al., 1986). A eficiência do teste aumentou gradativamente até alcançar a máxima

(97,0%) aos 60 DPI. Esses dados denotam que o teste de ELISA indireto é eficiente para detectar IgY em animais com infecção crônica, mas tem baixa sensibilidade nos casos de infecção aguda.

Nos animais do presente estudo, a soroconversão ocorreu a partir dos 21 DPI nos grupos infectados com 1000 e 5000 ovos, e aos 28 DPI nas aves que receberam 100 ovos, o que mostra a influência da dose infectante sobre o tempo de produção de anticorpos, como observado em camundongos (Ollero et al., 2008).

Em hospedeiros paratênicos, a soroconversão pode ser influenciada ainda pelas características individuais e pela espécie animal (Cuéllar et al., 2001). Em camundongos infectados com dose de 1000 ovos embrionados, por exemplo, a soroconversão foi observada aos 7 (Ollero et al., 2008), 14 (Kolbeková et al., 2011) e 15 DPI (Schoenardie et al., 2014).

Ainda em relação à resposta humoral, foi observado que, com o decorrer da infecção, os níveis de anticorpos se elevaram e tenderam a se manter estáveis a partir de 45 DPI. Comparativamente a outras espécies animais, a cinética de anticorpos aumenta com o transcorrer da infecção, corroborando os achados do presente estudo. Em suínos, Sommerfelt et al. (2006) verificaram um pico no nível de IgG entre 49 e 56 DPI, seguido de um decréscimo nos níveis de anticorpos. Em camundongos, o nível máximo de IgG foi verificado entre 42 e 56 DPI (Bowman et al., 1987).

A avidéz de anticorpos tem sido utilizada para classificação das fases de infecção de diversas doenças. No caso da toxocaríase humana, as fases aguda e crônica são caracterizadas pela presença de IgG de baixa e de alta avidéz, respectivamente (Hübner et al., 2001; Dziemian et al., 2008). No nosso estudo, foi observado aumento no IA no transcorrer da infecção, com observação de alta avidéz aos 28 DPI em todos os grupos. O aumento da IA pode ser explicado pela estimulação antigênica provocada

pelas larvas de *Toxocara* spp., que tende a elevar-se com o decorrer do tempo de infecção (Dziemian et al., 2008), fase crônica, como observado em camundongos infectados com 1000 ovos de *T. canis* (Fenoy et al., 1992; Schoenardie et al., 2014). Esse achado foi ratificado pela observação de um aumento significativo na média e correlação significativa entre o IR e IA das aves, independentemente da dose infectante, quando comparados a fase inicial ou aguda (7 a 21 DPI) com a fase final ou crônica (28 a 60 DPI).

O presente estudo tem algumas limitações. Entre elas, as aves utilizadas eram de linhagem de ciclo curto, o que limitou o tempo de avaliação da resposta humoral, para verificar a persistência de anticorpos por tempo prolongado, como verificado em estudos com suínos (Sommerfelt et al., 2006) e camundongos (Bowman et al., 1987; Schoenardie et al., 2014). No nosso estudo, a dose mínima para infecção das aves foi de 100 ovos. Chieffi et al. (1995) constataram a soropositividade ao ELISA antes de 30 DPI em camundongos infectados com 150 ou 200 ovos.

Com base nessas informações, novos estudos para a avaliação da persistência e avidéz de anticorpos são necessários para melhor compreensão da resposta humoral das aves na fase crônica de infecção. Da mesma forma, outros trabalhos são necessários para avaliação da dose mínima necessária para estimular a resposta humoral em frangos.

Casos de toxocaríase humana transmitida a partir do consumo de carne e víscera crua ou mal passada são recorrentes no mundo (Nagakura et al., 1989; Morimatsu et al., 2006). Ademais, a produção de frangos ecológicos tem crescido anualmente para suprir o aumento do consumo, uma vez que existe um número cada vez maior de pessoas interessadas em alimentos saudáveis, isentos de resíduos farmacológicos empregados na produção industrial de frangos, e preocupadas com o bem-estar animal (Figueiredo, 2014). Os frangos criados em sistema semi-intensivo ou extensivo, principalmente se

estiverem em locais coabitados por cães e gatos, têm maiores chances de infecção por geohelmintos devido ao seu hábito alimentar. Levando-se em consideração a possibilidade de reinfecção constante somado à persistência de larvas de *Toxocara* spp. nos tecidos com produção e manutenção de altos níveis de IgY durante longos períodos, a infecção dos frangos tende a ter um caráter crônico (Dziemian et al., 2008).

A técnica de ELISA pode ser uma excelente ferramenta para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* em aves na fase crônica de infecção, servindo tanto para estudos seroepidemiológicos como para avaliar o papel das aves como marcadores de contaminação ambiental por ovos de *Toxocara* spp.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Mestrado PROSUP a R. S. Raposo.

Referências

- Alvarado-Esquivel, C., 2013. Toxocariasis in waste pickers: a case control seroprevalence study. PLoS One 8, e54897.
- Azizi, S., Oryan, A., Sadjjadi, S.M., Zibaei, M., 2007. Histopathologic changes and larval recovery of *Toxocara cati* in experimentally infected chickens. Parasitol. Res. 102, 47–52.
- Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D.L., Santos, A., 2007. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 364 pp.

- Beaver, P.C., Snyder, C.H., Carrera, G.M., Dent, J.H., Lafferty, J.W., 1952. Chronic eosinophilia due to visceral larva *migrans*. Report of three cases. *Pediatrics*. 9, 7-19.
- Bowman, D., Dmika Grieve, M., Grieve, R., 1987. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody response in mice infected with *Toxocara canis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 75–82.
- Bowman, D.D., 2009. Diagnostic Parasitology. In: *Georgi's Parasitology for Veterinarians*. Bowman, D.D. 9 ed. Saunders-Elsevier: St. Louis. p. 295-371.
- Brasil, 2012. Resolução nº 1000. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. D.O.U. C.F.M.V., Brasília, 1000, 2 pp.
- Cardozo, S.P., Yamamura, M.H., 2004. Parasitas em produção de frangos no sistema de criação tipo colonial/caipira no Brasil. *Semina: Agrárias* 25, 63-74.
- Chieffi, P.P., Peres, B.A., De Mello, E.O., Kanamura, H., Brandão, M.M., 1995. Persistence of specific antibody response in different experimental infections of mice with *Toxocara canis* larvae. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 37, 187–190.
- Cuéllar, C., Fenoy, S., Del Aguila, C., Guillén, J.L., 2001. Isotype specific immune responses in murine experimental toxocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 549–553.
- De Savigny, D.H., 1975. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J. Parasitol.* 61, 781-782.

- De Savigny, D.H., Voller, A., Woodruff, A.W., 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Pathol.* 32, 284-288.
- Despommier D., 2003. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 265-272.
- Dutra, G.F., Pinto, N.S.F., De Avila, L.F.D.C., Dutra, P.C., Telmo, P.D.L., Rodrigues, L.H., Silva, A.M.W.A., Scaini, C.J., 2014. Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs. *Vet. Parasitol.* 203, 87–90.
- Dziemian, E., Zarnowska H., Kołodziej-Sobocińska, M., Machnicka, B., 2008. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. *Paras. Immunol.* 30, 187-190.
- 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.
- Embrapa, 2007. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves. Boas Práticas de Produção de Frangos de Corte. EMBRAPA-CNPSA (Circular Técnica, 51), Concórdia, 28 pp.
- Fenoy, S., Cuellar, C., Aguila, C., Guillén, J., 1992. Persistence of immune response in human toxocariasis by ELISA. *Int. J. Parasitol.* 22, 1037-1038.
- Figueiredo, E.A.P., 2014. Produção de Aves: Avicultura Agroecológica é possível. *Rev. CFMV* 20, 29-32.

- Finsterer, J., Auer, H., 2007. Neurotoxocarosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 49, 279–287.
- Galvin, T.J., 1964. Experimental *Toxocara canis* infections in chickens and pigeons. *J. Parasitol.* 50, 124–127.
- Glickman, L.T., Schantz, P.M., Grieve, R.B., 1986. Toxocariasis. In: Walls K.W., Schantz P.M. (Eds.). *Immunodiagnosis of Parasitic Diseases*, volume 1. Helminthic diseases. Academic Press, New York, pp. 201–231.
- Hedman, K., Lappalainen, M.; Seppaia, I., Makela, O., 1989. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Infect. Dis.* 159, 736-740.
- Hedman, K., Rousseau, S.A., 1989. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. *J. Med. Virol.* 27, 288-292.
- Hickman, M., 2008. Boycott of battery chickens forces supermarkets to think ethically. *The Independent.* <http://www.independent.co.uk/life-style/food-and-rink/news/the-campaign-that-changed-the-eating-habits-of-a-nation-788557.html> (acesso 21.03.2014).
- Hübner, J., Uhlikova, M., Leissova, M., 2001. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 50, 67-70.
- Kolbeková, P., Větvička, D., Svoboda, J., Skirnisson, K., Leissová, M., Syrůček, M., Marečková, H., Kolářová, L., 2011. *Toxocara canis* larvae reinfesting BALB/c mice exhibit accelerated speed of migration to the host CNS. *Parasitol. Res.* 109, 1267-1278.

- Lee, R.M., Moore, L.B., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J., 2014. Toxocariasis in North America: A Systematic Review. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 8(8), e3116.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1), 265-275.
- Mackinnon, A., 2000. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput. Biol. Med.* 30, 127-134.
- Magnaival, J.F., Glickman, L.T., Dorchies, P., Morassin, B., 2001. Highlights of human toxocariasis. *Korean J. Parasitol.* 39, 1–11.
- Magnaival, J.F., Michault, A., Calon, N., Charlet, J.P., 1994. Epidemiology of human toxocariasis in La Réunion. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 88(5), 531-533.
- Moreira, G.M., Telmo, P.D., 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.* pii: S1471-4922(14)00124-X. doi: 10.1016/j.pt.2014.07.003.
- 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.
- Munhoz, L.S., Vargas, G.D., Fischer, G., De Lima, M., Esteves, P.A., Hübner, S.O., 2014. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. *Cien. Rur.* 44, 153–160.

- Murakami, S., 2012. Cresce produção de frangos alternativos. Nippo. <http://www.nippo.com.br/campo/especiais/especial510.php> (acesso 11.05.2013).
- Nagakura, K., Tachibana, H., Kaneda, Y., Kato, Y., 1989. Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *J. Infect. Dis.* 160, 735–736.
- Ollero, M.D., Fenoy, S., Cuéllar, C., Guillén, J.L., Del Aguila, C., 2008. Experimental toxocariosis in BALB/c mice: effect of the inoculation dose on brain and eye involvement. *Acta Trop.* 105, 124-130.
- Pahari, T.K., Sasmal, N.K., 1990. Infection of Japanese quail with *Toxocara canis* larvae and establishment of patent infection in pups. *Vet. Parasitol.* 35, 357–364.
- Pecinali, N.R., Gomes, R.N., Amendoeira, F.C., Bastos, A.C.M.P., Martins, M.J.Q.A., Pegado, C.S., Bastos, O.M.P., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., 2005. Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet. Parasitol.* 134, 121–130.
- Rubinsky-Elefant, G., Hirata, C.E., Yamamoto, J.H., Ferreira, M.U., 2010. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Ann Trop Med Parasitol.* 104(1), 3-23.
- Schoenardie, E.R., Scaini, C.J., Avila, L.F.C., Sperotto, R.L., Borsuk, S., Felicetti, C.D.P., Pepe, M., Berne, M.E.A., 2014. Determination of IgG avidity in BALB/c mice experimentally infected with *Toxocara canis*. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23(3), 403-406.

- Sommerfelt, I.E., Santillan, G., Mira, G., Ribicich, M., Betti, A., De Torres, R., 2006. *Toxocara canis* infections in a pig model: immunological, haematological and blood biochemistry responses. *J. Helminthol.* 80, 73–77.
- Strube, C., Heuer, L., Janecek, E., 2013. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet. Parasitol.* 193, 375–389.
- Taira, K., Saeed, I., Lind, P., Murrell, K.D., Kapel, C.M.O., 2003a. Population dynamics of *Toxocara canis* in pigs receiving a single or multiple infection. *Parasitology* 127, 593–602.
- Taira, K., Permin, A., Kapel, C.M.O., 2003b. Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. *Parasitol. Res.* 90, 521–523.
- 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.
- USDA, 2014. Organic Agriculture: Organic Market Overview. United States Department of Agriculture. <http://www.ers.usda.gov/topics/natural-resources-environment/organic-agriculture/organic-market-overview.aspx#.U91YavldUgT> (acesso 02.08.2014).
- Zinkham, W.H., 1978. Visceral larva *migrans*. A review and reassessment indicating two forms of clinical expression: visceral and ocular. *Am. J. Dis. Child.* 132, 627–633.

Tabela 1. Estatísticas de avaliação do desempenho do ELISA para detecção de anticorpos IgY anti-*Toxocara* em soros de frangos inoculados com ovos de *Toxocara canis*, segundo a semana de colheita de amostras e as fases de infecção (Inicial: 7 a 21 dias; Final: 28 a 60 dias).

| Fases | Momentos Pós-Infecção (dias) | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------------------------------|-----|------|-----|------|-----|-------|------|------|------|------|------|
| | Inicial | | | | | | Final | | | | | |
| | 7 | | 14 | | 21 | | 28 | | 45 | | 60 | |
| Estimativas | Es. | ep | Es. | ep | Es. | ep | Es. | ep | Es. | ep | Es. | ep |
| Sensibilidade (%) | 0,0 | 0,0 | 27,8 | 7,5 | 47,2 | 8,3 | 66,7 | 7,9 | 91,7 | 4,6 | 96,8 | 3,2 |
| Especificidade (%) | 100 | 0,0 | 100 | 0,0 | 100 | 0,0 | 91,7 | 8,0 | 91,7 | 8,0 | 100 | 0,0 |
| Eficiência (%) | 25,0 | 6,3 | 45,8 | 7,2 | 60,4 | 7,1 | 72,9 | 6,4 | 91,7 | 4,0 | 97,0 | 3,0 |
| VPP (%) | - | - | 100 | 0,0 | 100 | 0,0 | 96,0 | 3,9 | 97,1 | 2,9 | 100 | 0,0 |
| VPN (%) | 25,0 | 6,3 | 31,6 | 7,5 | 38,7 | 8,8 | 47,8 | 10,4 | 78,6 | 11,0 | 66,7 | 27,2 |
| FP (%) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 8,3 | 8,0 | 8,3 | 8,0 | 0,0 | 0,0 |
| FN (%) | 100 | 0,0 | 72,2 | 7,5 | 52,8 | 8,3 | 33,3 | 7,9 | 8,3 | 8,0 | 3,2 | 3,2 |
| Índice Kappa | 0,0 | 0,0 | 16,1 | 6,1 | 30,9 | 8,9 | 44,7 | 11,6 | 79,0 | 10,0 | 78,4 | 20,1 |

Es.= estatística; ep= erro-padrão; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo; FP = Falso-positivo e FN = Falso-negativo.

Tabela 2. Índices de reatividade de anticorpos IgY (média \pm desvio-padrão) detectados pelo teste imunoenzimático ELISA, em frangos infectados experimentalmente com ovos de *Toxocara canis*, segundo os momentos pós-infecção e grupos experimentais.

| Grupo | Momentos Pós-infecção (em dias) | | | | | | |
|-----------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 | 45 | 60 |
| 100 ovos | 0,3 ^{Aa} \pm 0,2 | 0,4 ^{Aa} \pm 0,2 | 0,6 ^{Aa} \pm 0,3 | 0,8 ^{ABba} \pm 0,6 | 1,1 ^{ABbc} \pm 0,7 | 1,6 ^{Adc} \pm 0,8 | 1,6 ^{Ad} \pm 1,0 |
| 1000 ovos | 0,2 ^{Aa} \pm 0,1 | 0,3 ^{Aa} \pm 0,1 | 0,7 ^{Aa} \pm 0,5 | 1,1 ^{Aa} \pm 0,6 | 1,6 ^{Ab} \pm 0,7 | 2,2 ^{Bcb} \pm 0,5 | 2,2 ^{Bc} \pm 0,9 |
| 5000 ovos | 0,3 ^{Aa} \pm 0,1 | 0,5 ^{Aa} \pm 0,1 | 0,9 ^{Aba} \pm 0,5 | 1,3 ^{Ab} \pm 0,6 | 2,0 ^{Ac} \pm 0,8 | 2,5 ^{Bc} \pm 0,4 | 2,1 ^{Ac} \pm 1,1 |
| Controle | 0,4 ^{Aa} \pm 0,2 | 0,4 ^{Aa} \pm 0,0 | 0,4 ^{Aa} \pm 0,2 | 0,4 ^{Ba} \pm 0,2 | 0,4 ^{Bba} \pm 0,2 | 0,6 ^{Cb} \pm 0,2 | 0,8 ^{Cc} \pm 0,1 |

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um mesmo momento, pelo teste de Tukey, com valor de $P < 0,05$. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os momentos para um mesmo grupo, pelo teste de Bonferroni, com Valor de $P < 0,05$.

Tabela 3. Índices de avidéz de IgY (média \pm desvio-padrão) detectados pelo ensaio imunoenzimático ELISA, em frangos infectados experimentalmente com ovos de *Toxocara canis*, segundo os momentos pós-infecção e grupos experimentais.

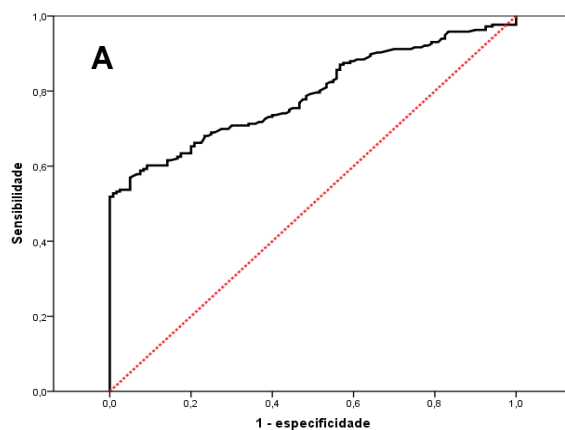
| Grupo | Momentos Pós-infecção (em dias) | | | | | |
|-----------|---------------------------------|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 7 | 14 | 21 | 28 | 45 | 60 |
| 100 ovos | NC | NC | NC | 56,5 \pm 9,2 | 60,7 \pm 10,3 | 62,7 \pm 11,8 |
| 1000 ovos | NC | NC | 49,9 \pm 15,5 | 59,6 \pm 11,0 | 68,1 \pm 13,6 | 71,1 \pm 11,9 |
| 5000 ovos | NC | NC | 47,9 \pm 11,5 | 61,9 \pm 12,0 | 70,3 \pm 10,7 | 75,1 \pm 7,8 |

NC: Não calculado: IR<1,0.

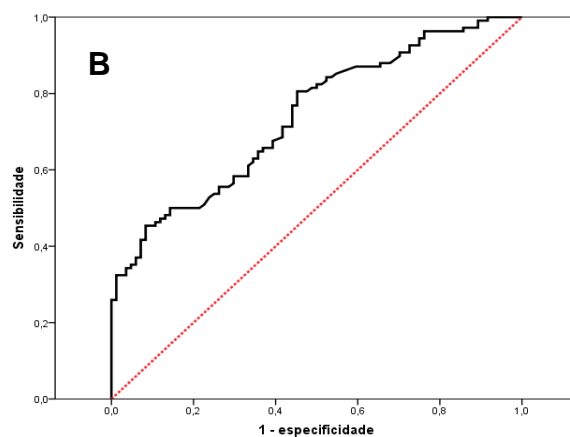
Tabela 4. Estimativa de coeficientes de correlação de Pearson (r) entre o índice de reatividade (IR) e o índice de avidéz (IA; %) de IgY detectadas pelo ELISA, em frangos infectados experimentalmente com diferentes doses de ovos de *Toxocara canis*, segundo os momentos pós-infecção e grupos experimentais.

| Grupo | Momentos Pós-infecção (em dias) | | | | | |
|-----------|---------------------------------|----|-----|------|------|------|
| | 7 | 14 | 21 | 28 | 45 | 60 |
| 100 ovos | NC | NC | NC | 0,6 | -0,2 | 0,3 |
| 1000 ovos | NC | NC | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 0,7* |
| 5000 ovos | NC | NC | 0,4 | 0,8* | 0,5 | 0,7* |

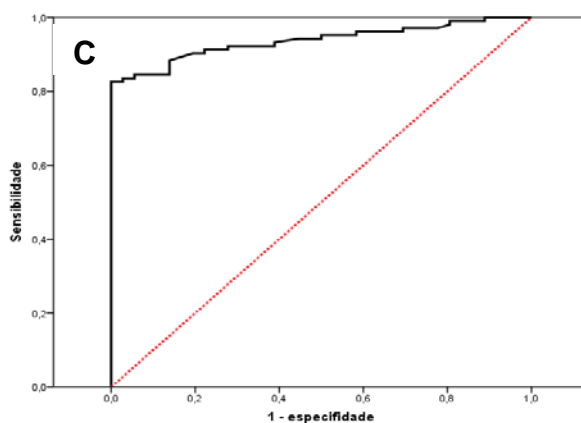
* Estimativas de correlação significativas a 5%. NC: Não calculado: IR<1,0.



Todos os momentos
 $AUC=0,790\pm 0,024$ (IC 95%: 0,744-0,837)



Fase Inicial
 $AUC=0,739\pm 0,035$ (IC 95%: 0,671-0,808)



Fase Final
 $AUC=0,893\pm 0,027$ (IC 95%: 0,841-0,945)

Fig. 1. Curva ROC para os valores de densidade óptica do ELISA para detecção de anticorpos IgY anti-*Toxocara* em soros de frangos inoculados com ovos de *Toxocara canis*, considerando-se todos os momentos (A), segundo a fase de infecção inicial (7 a 21 DPI) e final (28 a 60 DPI) do estudo.

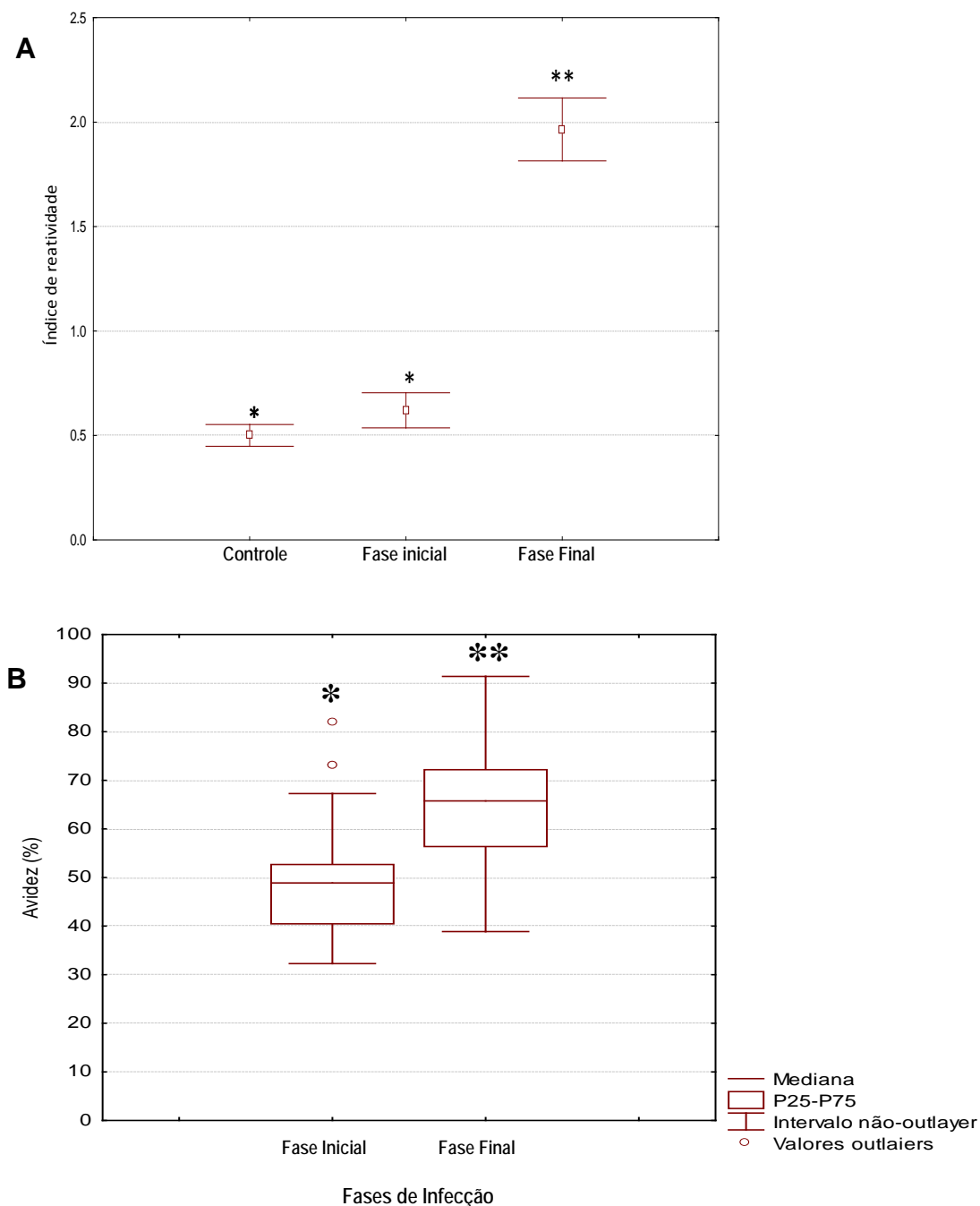


Fig. 2. Índices de reatividade (A) e de avidéz (%) de anticorpos anti-IgY (B) detectados pelo ensaio imunoenzimático ELISA, em frangos infectados experimentalmente com ovos de *Toxocara canis*. Fases inicial (7 a 21 DPI) e final (28 a 60 DPI). A = Barras encimadas com número diferente de asteriscos indicam diferenças entre as médias dos grupos pelo teste de Tukey (valor de $P < 0,0001$). B = Barras encimadas com número diferente de asteriscos indicam diferenças entre as medianas dos grupos pelo teste t de Student (Valor de $P < 0,0001$).

ANEXOS

Anexo 1 – Resultados do ELISA (Densidades Ópticas, Índices de Reatividade e Índices de Avidéz) das aves sororreagentes, segundo o momento de infecção. Aves 1 a 12: 100 ovos; aves 13 a 24: 1000 ovos; e aves 25 a 36: 5000 ovos. M1 = 7 DPI; M2 = 14 DPI; M3 = 21 DPI; M4 = 28 DPI; M5 = 45 DPI e M6 = 60 DPI.

| Soro (ave / momento) | Densidade Óptica | Índice de Reatividade | Índice de Avidéz (%) |
|----------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| 1M6 | 0,433 | 1,085 | 61,0 |
| 1M7 | 0,499 | 1,251 | 67,3 |
| 3M1 | 0,253 | 0,634 | 43,2 |
| 3M3 | 0,458 | 1,148 | 50,0 |
| 3M4 | 0,773 | 1,937 | 62,1 |
| 3M5 | 0,640 | 1,604 | 63,8 |
| 3M6 | 0,738 | 1,850 | 71,4 |
| 3M7 | 0,977 | 2,449 | 77,3 |
| 4M4 | 0,471 | 1,180 | 52,7 |
| 4M5 | 0,555 | 1,391 | 46,8 |
| 4M6 | 0,701 | 1,757 | 63,2 |
| 5M5 | 0,490 | 1,228 | 62,0 |
| 5M6 | 0,526 | 1,318 | 50,0 |
| 5M7 | 0,874 | 2,190 | 66,8 |
| 6M2 | 0,466 | 1,168 | 66,5 |
| 6M3 | 0,961 | 2,409 | 67,3 |
| 6M4 | 1,051 | 2,634 | 71,6 |
| 6M5 | 0,904 | 2,266 | 76,3 |
| 6M6 | 1,038 | 2,602 | 77,7 |
| 6M7 | 1,026 | 2,571 | 85,1 |
| 7M5 | 0,881 | 2,208 | 52,2% |
| 7M6 | 0,895 | 2,243 | 48,0% |
| 7M7 | 0,976 | 2,446 | 62,3% |
| 8M4 | 0,475 | 1,190 | 43,6 |
| 8M5 | 0,544 | 1,363 | 59,7 |
| 8M6 | 0,748 | 1,875 | 61,1 |
| 8M7 | 0,926 | 2,321 | 76,6 |
| 10M3 | 0,444 | 1,113 | - |
| 10M5 | 0,968 | 2,426 | 50,1 |
| 10M7 | 1,165 | 2,920 | 53,1 |
| 11M5 | 0,481 | 1,206 | 53,8 |
| 11M6 | 0,439 | 1,100 | 45,6 |
| 11M7 | 0,476 | 1,193 | 59,7 |
| 12M5 | 0,903 | 2,263 | 66,8 |
| 12M6 | 1,106 | 2,772 | 74,2 |
| 12M7 | 1,077 | 2,699 | 79,1 |

Anexo 1 (Continuação) – Resultados do ELISA (Densidades Ópticas, Índices de Reatividade e Índices de Avidéz) das aves sororreagentes, segundo o momento de infecção. Aves 1 a 12: 100 ovos; aves 13 a 24: 1000 ovos; e aves 25 a 36: 5000 ovos. M1 = 7 DPI; M2 = 14 DPI; M3 = 21 DPI; M4 = 28 DPI; M5 = 45 DPI e M6 = 60 DPI.

| Soro (ave / momento) | Densidade Óptica | Índice de Reatividade | Índice de Avidéz (%) |
|----------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| 13M3 | 0,683 | 1,712 | 40,4 |
| 13M4 | 0,763 | 1,912 | 48,8 |
| 13M5 | 0,920 | 2,306 | 57,8 |
| 13M6 | 1,120 | 2,807 | 71,9 |
| 14M2 | 0,601 | 1,506 | 73,2 |
| 14M3 | 0,794 | 1,990 | 81,9 |
| 14M4 | 1,092 | 2,737 | 85,1 |
| 14M5 | 1,011 | 2,534 | 82,9 |
| 14M6 | 1,049 | 2,629 | 83,7 |
| 14M7 | 0,909 | 2,278 | 89,0 |
| 15M4 | 0,842 | 2,110 | 72,2 |
| 15M5 | 0,860 | 2,155 | 75,0 |
| 16M5 | 0,474 | 1,188 | 42,0 |
| 16M6 | 0,643 | 1,612 | 49,9 |
| 16M7 | 0,828 | 2,075 | 72,9 |
| 17M2 | 0,473 | 1,185 | 45,2 |
| 17M3 | 0,448 | 1,123 | 44,4 |
| 17M4 | 0,872 | 2,185 | 55,4 |
| 17M5 | 0,955 | 2,393 | 71,5 |
| 17M6 | 1,080 | 2,707 | 73,9 |
| 18M5 | 0,835 | 2,093 | 91,4 |
| 18M6 | 1,117 | 2,799 | 90,4 |
| 18M7 | 1,033 | 2,589 | 86,2 |
| 19M3 | 0,604 | 1,514 | 49,3 |
| 19M4 | 0,752 | 1,885 | 54,0 |
| 19M5 | 0,903 | 2,263 | 64,0 |
| 19M6 | 0,978 | 2,451 | 69,4 |
| 19M7 | 0,769 | 1,927 | 65,3 |
| 20M2 | 0,473 | 1,185 | 49,9 |
| 20M3 | 0,578 | 1,449 | 51,2 |
| 20M4 | 0,608 | 1,524 | 56,6 |
| 20M5 | 0,862 | 2,160 | 61,4 |
| 20M6 | 0,864 | 2,165 | 56,4 |
| 20M7 | 0,842 | 2,110 | 64,3 |

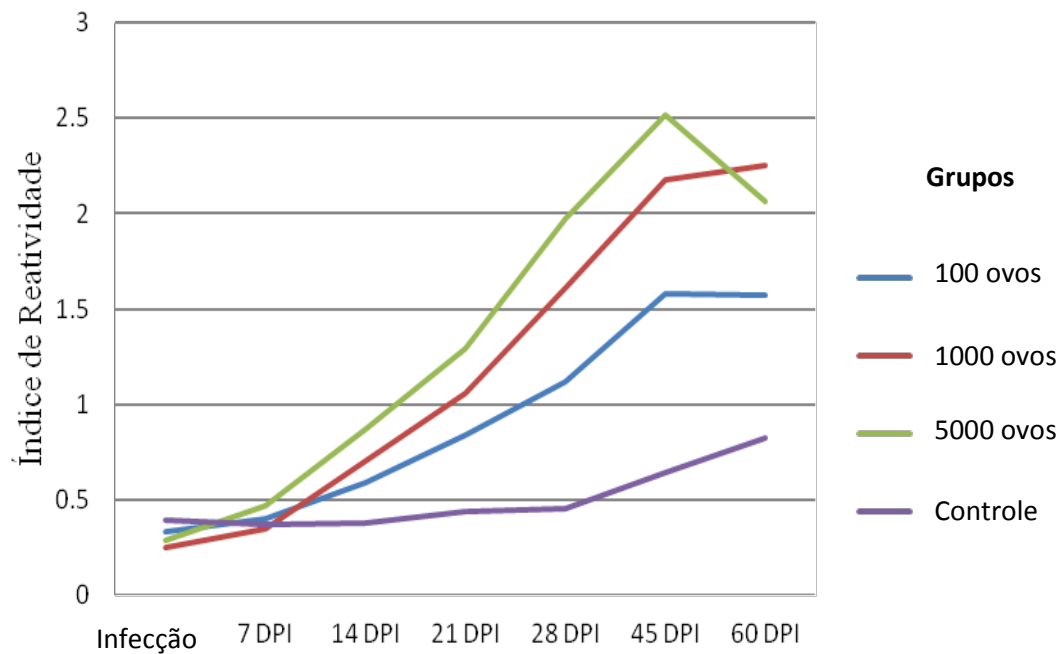
Anexo 1 (Continuação) – Resultados do ELISA (Densidades Ópticas, Índices de Reatividade e Índices de Avidéz) das aves sororreagentes, segundo o momento de infecção. Aves 1 a 12: 100 ovos; aves 13 a 24: 1000 ovos; e aves 25 a 36: 5000 ovos. M1 = 7 DPI; M2 = 14 DPI; M3 = 21 DPI; M4 = 28 DPI; M5 = 45 DPI e M6 = 60 DPI.

| Soro (ave / momento) | Densidade Óptica | Índice de Reatividade | Índice de Avidéz (%) |
|----------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| 21M5 | 0,530 | 1,328 | 70,8 |
| 21M6 | 0,596 | 1,494 | 66,8 |
| 21M7 | 0,658 | 1,649 | 58,7 |
| 22M4 | 0,448 | 1,123 | 50,0 |
| 22M5 | 0,586 | 1,469 | 60,8 |
| 22M6 | 0,643 | 1,612 | 67,0 |
| 22M7 | 0,732 | 1,835 | 56,4 |
| 23M5 | 0,823 | 2,063 | 57,6 |
| 23M6 | 0,811 | 2,033 | 68,6 |
| 23M7 | 0,729 | 1,827 | 70,6 |
| 24M4 | 0,470 | 1,178 | 67,9 |
| 24M5 | 0,877 | 2,198 | 82,2 |
| 24M6 | 1,031 | 2,584 | 84,5 |
| 24M7 | 0,856 | 2,145 | 79,0 |
| 25M3 | 0,459 | 1,150 | 45,8 |
| 25M4 | 0,473 | 1,185 | 54,5 |
| 25M5 | 0,891 | 2,233 | 81,8 |
| 25M6 | 1,005 | 2,519 | 79,9 |
| 25M7 | 1,036 | 2,596 | 76,2 |
| 26M2 | 0,444 | 1,113 | 40,3 |
| 26M3 | 0,733 | 1,837 | 40,5 |
| 26M4 | 0,992 | 2,486 | 69,3 |
| 26M5 | 1,052 | 2,637 | 78,2 |
| 26M6 | 1,096 | 2,747 | 81,6 |
| 26M7 | 1,214 | 3,043 | 85,3 |
| 27M3 | 0,472 | 1,183 | 44,5 |
| 27M4 | 0,782 | 1,960 | 66,5 |
| 27M5 | 0,871 | 2,183 | 68,5 |
| 27M6 | 0,929 | 2,328 | 64,0 |
| 27M7 | 0,792 | 1,985 | 67,3 |
| 28M5 | 0,572 | 1,434 | 60,0 |
| 28M6 | 0,711 | 1,782 | 69,8 |
| 28M7 | 0,981 | 2,459 | 74,5 |
| 29M2 | 0,588 | 1,474 | 53,6 |
| 29M3 | 0,696 | 1,744 | 73,1 |
| 29M4 | 1,049 | 2,629 | 85,5 |
| 29M5 | 0,950 | 2,381 | 80,1 |
| 29M6 | 0,975 | 2,444 | 79,9 |

Anexo 1 (Continuação) – Resultados do ELISA (Densidades Ópticas, Índices de Reatividade e Índices de Aidez) das aves sororreagentes, segundo o momento de infecção. Aves 1 a 12: 100 ovos; aves 13 a 24: 1000 ovos; e aves 25 a 36: 5000 ovos. M1 = 7 DPI; M2 = 14 DPI; M3 = 21 DPI; M4 = 28 DPI; M5 = 45 DPI e M6 = 60 DPI.

| Soro (ave / momento) | Densidade Óptica | Índice de Reatividade | Índice de Aidez (%) |
|----------------------|------------------|-----------------------|---------------------|
| 30M3 | 0,669 | 1,677 | 35,3 |
| 30M4 | 0,945 | 2,368 | 50,6 |
| 30M5 | 1,136 | 2,847 | 71,7 |
| 30M6 | 1,120 | 2,807 | 82,7 |
| 30M7 | 1,053 | 2,639 | 93,5 |
| 31M4 | 0,789 | 1,977 | 56,8 |
| 31M5 | 1,063 | 2,664 | 71,7 |
| 32M1 | 0,418 | 1,048 | 32,3 |
| 32M2 | 0,564 | 1,414 | 34,8 |
| 32M3 | 0,814 | 2,040 | 58,4 |
| 32M4 | 0,765 | 1,917 | 61,6 |
| 32M5 | 0,773 | 1,937 | 67,0 |
| 32M6 | 0,683 | 1,712 | 71,4 |
| 32M7 | 0,680 | 1,704 | 65,0 |
| 33M2 | 0,572 | 1,434 | 44,9 |
| 33M3 | 0,500 | 1,253 | 50,4 |
| 33M4 | 1,002 | 2,511 | 71,6 |
| 33M5 | 1,065 | 2,669 | 88,3 |
| 34M2 | 0,522 | 1,308 | 52,3 |
| 34M3 | 0,461 | 1,155 | 43,0 |
| 34M4 | 0,870 | 2,180 | 70,7 |
| 34M5 | 0,907 | 2,273 | 66,0 |
| 34M6 | 0,997 | 2,499 | 69,8 |
| 35M5 | 0,798 | 2,000 | 49,1 |
| 35M6 | 0,564 | 1,414 | 65,8 |
| 35M7 | 0,638 | 1,599 | 71,5 |
| 36M4 | 0,524 | 1,313 | 55,0 |
| 36M5 | 1,043 | 2,614 | 64,9 |
| 36M6 | 1,026 | 2,571 | 86,1 |
| 36M7 | 1,108 | 2,777 | 82,3 |

Anexo 2 – Média dos Índices de reatividade de IgY detectadas pelo ELISA, em frangos infectados experimentalmente com *Toxocara canis*, segundo os momentos pós-infecção e grupos experimentais. DPI = Dias pós-infecção.



Anexo 3 – Média dos Índices de Avidéz de IgY detectadas pelo ELISA, em frangos infectados experimentalmente com *Toxocara canis*, segundo os momentos pós-infecção e grupos experimentais. DPI = Dias pós-infecção.

