



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

DIAGNÓSTICO IMUNOENZIMÁTICO DA LARVA MIGRANS VISCERAL

ELIZANDRA ROSELAINÉ SCHOENARDIE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Profa. Maria Elisabeth Aires Berne, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

PELOTAS, 2005
Rio Grande do Sul – Brasil
Junho de 2005



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

DIAGNÓSTICO IMUNOENZIMÁTICO DA LARVA MIGRANS VISCERAL

ELIZANDRA ROSELAINÉ SCHOENARDIE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Profa. Maria Elisabeth Aires Berne, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

PELOTAS, 2005
Rio Grande do Sul – Brasil
Junho de 2005

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S365d Schoenardie, Elizandra Roselaine
 Diagnóstico imunoenzimático da larva migrans visceral /
 Elizandra Roselaine Schoenardie ; orientador Maria Elisabeth
 Aires Berne. – Pelotas, 2005. – 59f. : il. – Dissertação
 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
 Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de
 Pelotas. Pelotas, 2005.

1.Biotecnologia. 2.Camundongo. 3.Larva Migrans
Visceral. 4.Soroprevalência. 5.*Toxocara canis*. 6. Zoonoses.
7.Imunologia. I.Berne, Maria Elisabeth Aires. II.Título.

CDD: 591.29

ELIZANDRA ROSELAINÉ SCHOENARDIE

DIAGNÓSTICO IMUNOENZIMÁTICO DA LARVA MIGRANS VISCERAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a. Maria Elisabeth Aires Berne, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovada em 24 de junho de 2005

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Antônio Guimarães Aleixo - UFPel

Prof. Dr. Carlos James Scaini - Furg

Prof.^a Ana Maria Barral Martinez - Furg

Prof^a. Maria Elisabeth Aires Berne - UFPel (Orientadora)

AGRADECIMENTO

A Deus, que dá a vida, o amor, a esperança, a sabedoria e a coragem de lutar por um ideal seguindo os melhores caminhos.

A minha orientadora Professora Maria Elisabeth Aires Berne, pela acessibilidade, amizade e carinho, por me incentivar e orientar para que pudesse cumprir minhas tarefas.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (Capes) pela bolsa que me foi concedida.

Aos colegas e amigos do laboratório de parasitologia: Neila, Anelise, Michele Pepe, Tiago, Alice, Joziani, Daniela, Michele Peres, Ana Paula Ferreira, Afonso, Jerônimo e Dona Vera pela colaboração prestada no decorrer do trabalho.

A todos os mestres que tiveram um importante papel na minha formação e aos quais sempre vou lembrar com muito carinho.

Aos colegas de Centro de Biotecnologia, em especial ao laboratório de Imunologia Aplicada, onde fui bem recebida.

Aos professores Carlos James Scaini e Claudiomar Soares Brod pelo apoio prestado para a realização do experimento e ao professor Tomaz Lucia Junior pela orientação estatística.

Aos meus pais, Valderes e Aldorema, pela vida, pelo amor e pela confiança que depositaram em mim.

Ao meu namorado Roni pelo seu amor, amizade, carinho e incentivo.

As amigas Etiane, Vanessa e Kérilin que dividiram comigo não só o espaço físico, mas também um pedaço de suas vidas.

Enfim, agradeço a todos amigos que de alguma forma estiveram por perto me auxiliando e passando seus conhecimentos.

INDICE

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
SUMÁRIO	ix
SUMARY	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
Sintomas e sinais clínicos	3
Contaminação ambiental	4
Fatores de risco e soroepidemiologia	6
Discriminação das fases aguda e crônica	9
3. ARTIGO 1 - SORODIAGNÓSTICO DA LARVA MIGRANS VISCERAL EM CRIANÇAS DA REGIÃO DE PELOTAS, RS	11
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAIS E MÉTODOS	15
Produção do Antígeno TES	15
Produção de antígeno Somático de <i>Ascaris lumbricoides</i> (AgSoAl)	16
Determinação da concentração protéica dos antígenos	16
Eletoforese dos antígenos	17
Grupo de Amostragem	17
Adsorção dos soros com AgSoAl	17
Técnica de ELISA indireto	18
Técnica de “Western blotting”	18

Estudo dos riscos de infecção	19
Análise Estatística.....	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
REFERÊNCIAS.....	29
4. ARTIGO 2 - DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DA IgG EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM <i>T. canis</i>	33
RESUMO	33
ABSTRACT.....	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAIS E MÉTODOS	37
Obtenção dos parasitos e produção do antígeno TES	37
Camundongos BALB/c.....	37
Inoculação com ovos de <i>T.canis</i> e colheita de sangue	38
Teste de ELISA indireto	38
Cálculo determinante da avidéz da IgG	39
Sacrifício dos animais	39
Análise Estatística.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	45
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	48
6. REFERÊNCIAS GERAIS	49
APÊNDICE A	58

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1	Fatores de risco associados com a soropositividade de anticorpos IgG anti- <i>T. canis</i> em crianças da região de Pelotas.....	24
-----------------	--	----

ARTIGO 2

TABELA 1	Número de larvas presentes no encéfalo de camundongos e absorbências pela técnica de ELISA Indireto frente ao TES, 105 dias após a infecção.....	41
-----------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- FIGURA 1** Perfil eletroforético dos antígenos: AgSoAl – 30µg (1), 15µg (2); TES – 15µg (3), 20µg (4); marcador de peso molecular (10 –220 kDa, Invitrogen- Bench Mark TM) (5).....20
- FIGURA 2** Padrão de bandas do antígeno TES no “Western blotting” reconhecidas por soros humanos positivos no ELISA Indireto (1-15), controle positivo (16) e controle negativo (17).....25
- FIGURA 3** Padrão de bandas do AgSoAl no “Western blotting” reconhecidas por soros humanos positivos no ELISA Indireto (1-8 e 10-15), controle positivo (16) e controles negativos (9 e 17).....27
- FIGURA 4** Padrão de bandas do TES no “Western blotting” reconhecidos por soros humanos positivos no ELISA-TES não adsorvidos (1, 3, 5, 7, 9, 11) e adsorvidos (2, 4, 6, 8, 10, 12) com AgSoAl, controle positivo (13-14) e negativo (16-17) não adsorvidos e adsorvidos, respectivamente.....27

ARTIGO 2

- FIGURA 1** Absorbâncias médias da IgG do soro de camundongos experimentalmente infectados com *T. canis*, tratado e não tratado com uréia 6M, através do ELISA Indireto.....42
- FIGURA 2** Percentual de avidéz da IgG anti-TES através de ELISA Indireto em 25 camundongos experimentalmente infectados com ovos de *T. canis*, nos diferentes dias pós-inoculação.....43

SUMÁRIO

SCHOENARDIE, ELIZANDRA ROSELAINE. M.S. Universidade Federal de Pelotas, maio de 2005. **Diagnóstico imunoenzimático da Larva migrans visceral**. Orientadora: Maria Elisabeth Aires Berne.

A Larva Migrans Visceral (LMV) é uma doença zoonótica que possui como principal agente etiológico o helminto *Toxocara canis*. O diagnóstico precoce da doença no homem é importante para estudos de evolução clínica e tratamento do paciente e os inquéritos epidemiológicos para determinar a frequência da infecção em uma população. Por isso, o primeiro experimento teve como objetivo, determinar a presença de anticorpos anti-*T. canis* em crianças da região de Pelotas através de *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) com o antígeno de excreção e secreção de larvas de *Toxocara canis* (TES), bem como definir, através de “Western blotting”, o padrão de bandas do TES reconhecidas pelos soros positivos ao ELISA. Foram ensaiados no ELISA Indireto 427 soros de crianças de um a 12 anos de idade adsorvidos com antígeno somático de *Ascaris lumbricoides* e determinado que 50,6% apresentaram anticorpos anti-TES, ocorrendo uma associação significativa entre as crianças positivas e o contato com cães e gatos. Esta associação também foi observada em diferentes faixas etárias das crianças, mas não com relação ao sexo das mesmas. Setenta soros positivos no ELISA foram ensaiados no “Western blotting” e todos reconheceram frações proteicas entre 30 e 120 kDa. Uma diminuição da reação cruzada com o AgSoAl foi observada quando soros adsorvidos com este antígeno foram testados no “Western blotting”, sendo que uma fração antigênica de 30 kDa apresentou-se como uma proteína importante para o diagnóstico específico da LMV. No segundo experimento, 25 camundongos BALB/c foram inoculados com

aproximadamente 1000 ovos contendo a larva infectante (L₃). Colheitas quinzenais de sangue foram realizadas através do plexo retro orbital até os 105 dias pós-infecção dos animais. Os soros foram ensaiados no ELISA Indireto utilizando o antígeno TES e a uréia 6M a fim de discriminar infecção recente e tardia, através do percentual de avides da IgG nos diferentes dias após a infecção. Um baixo percentual de avides, característico da infecção aguda, foi observado aos 15 dias pós-inoculação (entre 7,3 e 27,5%). Após 60 dias de infecção, todos os animais apresentaram avides entre 31,4 e 58%. Através destes resultados, sugere-se que em camundongos BALB/c, aos 60 dias pós-infecção a fase crônica da LMV já está estabelecida.

SUMARY

SCHOENARDIE, ELIZANDRA ROSELAINÉ. M.S. Universidade Federal de Pelotas, may of 2005. **Immunoenzimatic Diagnosis of the Visceral larva migrans**. Orientadora: Maria Elisabeth Aires Berne.

The Visceral Larva Migrans (VLM) is a zoonotic disease caused by the helminth *Toxocara canis*. The precocious diagnosis of this disease in humans is very important to determinate the evolution of the clinical case and the patient's treatment. The goal of the first experiment was determinate the presence of antibodies anti-*T. canis* in children from Pelotas through the Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) front to the antigen TES, as well as to define the pattern of bands recognized by the positive serums in ELISA through the "Western blotting". For this experiment 427 serums from children, with ages between one to eleven yeas old was tested, those serums was adsorved with AgSoAl and determinate that 50,6% was positive for antibodies anti-TES, showing a significant association among the positive children for antibodies anti-TES and the contact with dogs and cats. This association was also observed in the children's different age groups, but not regarding the gender of the same ones. To perform the "Western Blotting", 70 serums witch give a positive result in the Indirect ELISA was been used, all serums recognize glicoproteic bands in the range between 30 and 120 kDa. Was observed a diminution in the crusade reaction with AgSoAl when the adsorved and not adsorved serums with this antigen has been test in the "Western blotting", where a band of 30 kDa demonstrate to be an important glicoprotein to specific diagnosis of VLM. In the second experiment, 25 mice BALB/c were inoculated with approximately 1000 eggs containing the larvae L₃. Each fifteen days blood

collection was made through the retro orbital plexus until the 105 days after de animals infection. The serums was tested in the Indirect ELISA using the Antigen TES and urea 6M in order to discriminate recent and late infection, through the percentile of avidity of the IgG in the different days after the infection. A low percentile of avidity was observed to the 15 days after inoculation (between 7,25 and 27,5%). After 60 days of infection, all the animals presented avidity between 31,4 and 58%. This result suggests that in mice BALB/c, to the 60 days after infection the chronic phase of VLM is already established.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Larva Migrans Visceral (LMV) foi descrita pela primeira por Beaver et al. (1952). Atualmente, sabe-se que esta síndrome constitui um sério problema para a saúde pública e que embora não seja causa freqüente de mortalidade pode levar o paciente à diminuição na sua produtividade e perdas econômicas com tratamento e diagnóstico (Schantz, 1991).

Parasitos comuns de animais domésticos podem causar LMV, entretanto, o nematódeo *Toxocara canis*, parasito do intestino delgado de cães e gatos, pertencente à Ordem Ascaridida e Família Anisakidae; é o principal agente etiológico desta síndrome, devido a sua elevada prevalência, padrão de migração e período de sobrevivência das larvas no hospedeiro.

O ascarídeo *T. canis* têm distribuição mundial e além dos hospedeiros definitivos pode apresentar vários hospedeiros acidentais ou erráticos, que são assim chamados já que nestes não ocorre o desenvolvimento das larvas e a forma adulta do parasito.

O homem se comporta como hospedeiro acidental do *T. canis* e se infecta através da ingestão de ovos embrionados contendo a larva infectante (L₃), provenientes de alimentos, água, mãos ou solo contaminados. Após a infecção, as larvas migram para diversos tecidos do corpo e se estabelecem no fígado, pulmão, coração, encéfalo, rins, músculos estriados e gânglios linfáticos. Nestes locais podem permanecer viáveis por vários anos ou induzirem a formação de granulomas e serem destruídas pelo sistema imunológico.

Devido a inespecificidade dos sintomas e sinais clínicos e a falta de conhecimento por parte dos profissionais da área da saúde, a LMV foi durante muito tempo pouco diagnosticada (Abe Jacob et al., 1987). O aumento de pesquisas no âmbito da epidemiologia, patogenia e diagnóstico da LMV, têm

levado a suspeita da doença em muitos casos de inespecificidade da sintomatologia, ocorrendo com isso, um aumento de relatos desta síndrome.

O diagnóstico da LMV baseia-se em dados epidemiológicos como o contato com cães jovens, sinais clínicos como hepatomegalia e achados laboratoriais como a eosinofilia. Porém, o diagnóstico definitivo é realizado através da biópsia dos tecidos lesados pela visualização das larvas. No entanto, este é um método invasivo e muitas vezes inconclusivo, tornando-se inviável na maioria dos casos (Schantz & Glikcman, 1983).

Atualmente, a utilização do teste ELISA (Enzyme linked immnosorbent assay) e o “Western blotting” juntamente com o antígeno de excreção e secreção de larvas de *Toxocara canis* (TES), têm contribuído no imunodiagnóstico de pacientes com suspeitas da LMV. Entretanto existem problemas relacionados a reações cruzadas com antígenos de outros parasitos freqüentes no homem, como *Ascaris lumbricoides*. Devido a isto, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando maior sensibilidade e especificidade dos testes.

Também, outro aspecto importante, é a dificuldade de discriminar as diferentes fases da doença, fator relevante não apenas para estudos epidemiológicos como também para determinar o tratamento adequado ao paciente na fase aguda ou crônica da LMV, evitando assim uma maior morbidade (Machado & El Achkar, 2003).

Este trabalho teve como objetivos: determinar a soroprevalência da LMV em crianças de um a 12 anos da região de Pelotas utilizando o ELISA Indireto associado ao antígeno TES, identificar o padrão de bandas do antígeno reconhecidas pelos soros positivos no ELISA através de “Western blotting” considerando alguns fatores de risco predisponentes a Toxocariose humana, discriminar as infecções aguda e crônica da LMV em camundongos experimentalmente infectados com *T. canis* utilizando uréia 6M e ELISA Indireto e relacionar os níveis de anticorpos com a presença de larvas no encéfalo destes animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A Síndrome da Larva Migrans Visceral também denominada por muitos autores como Toxocarose Humana, foi identificada por Beaver et al. (1952), ao encontrarem larvas de helminto no tecido hepático de três crianças. Posteriormente, esta doença foi definida como sendo resultante de uma migração prolongada de larvas de nematódeos em tecidos de hospedeiros não habituais, dentre os quais está o homem (Beaver, 1969). A partir deste momento, iniciaram-se vários estudos a fim de determinar aspectos importantes da doença, como patogenia, epidemiologia, controle, diagnóstico e tratamento.

Sintomas e sinais clínicos

A infecção não é sempre relatada com manifestações clínicas. Os sintomas e sinais clínicos são dependentes do tecido e órgão parasitado, do número de ovos ingeridos e da intensidade da resposta inflamatória. Nos tecidos, as larvas podem ser encapsuladas formando granulomas, onde são destruídas ou persistem viáveis durante anos (Magnaval et al., 2001). São freqüentes sinais clínicos como eosinofilia, aumento do número de imunoglobulinas IgG, IgM e IgE, esplenomegalia, hepatomegalia, além de sintomas respiratórios e febre (Despommier, 2003).

Existem relatos de LMV associada a distúrbios sistêmicos. Os sintomas pulmonares foram relatados em 20 a 85% dos casos de crianças com a síndrome. Além disso, a migração larval pode resultar em quadros de asma (Bachmeyer et al., 2003).

Estudos conduzidos em 40 crianças com diagnóstico de toxocarose visceral, estabelecido através de avaliações clínicas, laboratoriais e teste

ELISA específico, mostraram alta incidência de manifestações pulmonares, sugerindo que a doença poderia ser incluída no diagnóstico diferencial de crianças com histórico de envolvimento pulmonar e dados epidemiológico compatíveis com LMV, associados a eosinofilia (Abe Jacob et al., 1994).

Também, miocardite (Prunier et al., 2001), e nefrite (Shetty & Aviles, 1999) já foram associados à síndrome, além do relato de que a toxocarose humana pode ser um fator predisponente ao aparecimento de abscesso piogênico no fígado (Rayes et al., 2001) e de que o infiltrado de eosinófilos pode ser confundido com células malignas em exames de radiografia, levando a um diagnóstico errôneo, como linfoma (Bachmeyer et al., 2003).

O encéfalo também é um tecido de importante deposição larval. Segundo Moreira-Silva et al. (2004), nos últimos 50 anos, foram relatados 29 casos de neurotoxocarose humana, dos quais 20 apresentaram alterações clínicas e laboratoriais indicativas de meningite, ou encefalite, ou mielite, ou radiculite eosinofílica. Experimentos realizados com camundongos demonstraram que houve um aumento progressivo de larvas no encéfalo a partir dos quatro dias após a infecção e que estas podem permanecer vivas por vários meses neste tecido (Dusmore et al., 1983).

Contaminação ambiental

O nematódeo *Toxocara canis*, considerado o principal agente etiológico da LMV, é freqüentemente identificado em estudos de prevalência de parasitos em cães e gatos e, em levantamentos epidemiológicos de ambientes potencialmente contaminados com fezes destes animais. Avaliações epidemiológicas de parasitos intestinais de cães, mostraram uma ampla variação de animais positivos para ovos de *T. canis* entre 4,1% (Milano & Oscherov, 2001) a 90% (Soulsby et al., 1991).

Quando se observa a idade dos animais, verifica-se que os cães jovens representam os maiores disseminadores de ovos no ambiente, já que desenvolvem resistência ao parasito apenas após alguns meses de idade. Isto foi confirmando em estudos de prevalência deste nematódeo em fezes caninas, quando a maior freqüência de exames positivos ocorreu em cães jovens (Oliveira-Serqueira et al., 2002). Avaliando cães de diferentes idades, Habluetzel et al. (2003) mostraram que dos 33,6% animais em que foi

diagnosticada a infecção por *T. canis*, 72,4% tinham menos de três meses de idade e apenas 15,7% tinham mais de um ano. Antolová et al. (2004), observaram que 50% dos cães jovens e apenas 12,4% dos cães com mais de oitos meses de idade estavam parasitados por *T. canis*.

Na análise de amostras de alimentos e solos de parques, praias e praças públicas, ovos de *T. canis* também estiveram presentes, principalmente em países de clima tropical (Magnaival et al., 2001). Em estudos conduzidos na cidade do México por Tsuji et al. (1996), foi verificado que 12,5% das amostras de solo de 281 praças estavam contaminadas por ovos de *Toxocara* spp., sendo que 90% destes estavam embrionados ou larvados. No Chile, 18,2% das amostras de solo analisadas estavam positivas para ovos de *T. canis* (Salinas et al., 2001).

No Brasil, embora os relatos de casos de LMV ainda sejam escassos, existem condições epidemiológicas favoráveis à ocorrência da doença. Pesquisas de contaminação ambiental já foram desenvolvidas em várias regiões do país. Em Salvador, BA, 24,8% das amostras de solo de praias, parques e praças públicas, estavam contaminadas por ovos de *Toxocara* spp (Alcântara et al., 1989). Na região de Botucatu, São Paulo, a contaminação ambiental por ovos desse parasito foi verificada em 17,5% das 120 amostras de solos de praças e parques públicos da cidade, estando 60% dos locais contaminados (Santarém et al., 1998). Em Pelotas, 38,98% das amostras de areia coletadas na praia do Laranjal estavam contaminadas por ovos de helmintos, e destes 16,09% eram ovos de *Toxocara* spp. (Ferraz, 2002) e em outro estudo, 33,3% das amostras de praças de conjuntos habitacionais desta cidade foram positivas para presença de ovos de *Toxocara* spp (Tavares, 1999).

O consumo humano de verduras contaminadas também é um importante fator que deve ser considerado. Ovos de *Toxocara* spp. foram encontrados em 1,1% das 536 amostras de verduras que eram cultivadas em terrenos propícios ao hábito de defecação de cães e gatos (Tsuji et al., 1997). A presença de ovos e oocistos de endoparasitos também foi constatada em 27,7% das amostras de hortaliças comercializadas na cidade de Pelotas, sendo que dentre os ovos de helmintos encontrados foram identificados ovos de *T. canis* (Santos et al.,

1998). Em adição, Guilherme et al. (1999), também encontraram em hortaliças consumidas na cidade de Maringá, PR, ovos de parasitos, incluindo *T. canis*.

Fatores de risco e soroepidemiologia

Além da contaminação ambiental pelos ovos do parasito, os hábitos higiênicos e fatores comportamentais como a geofagia e onicofagia podem estar relacionados ao aumento da frequência de infecção no homem. Um estudo soroepidemiológico realizado com crianças em idade escolar na região de Butantã, São Paulo, demonstrou que 44,9% dos indivíduos positivos para anticorpos anti-TES no ELISA tinham hábitos de onicofagia considerando este um fator epidemiológico importante para a infecção das mesmas (Alderete et al., 2003). Segundo Despomer (2003), crianças com hábito de geofagia e aquelas que residiam em regiões mais pobres tiveram maiores chances de ingerir ovos embrionados que outras não inseridas neste contexto. Além disso, a presença de cães jovens como animais de estimação foi identificada como um fator de risco importante para a infecção humana (Marmor et al., 1987; Fan et al., 2004), embora estudos tenham relatado que o contato com animais infectados não proporcionou um risco maior a infecção (Glickman & Schantz, 1981; Ajayi et al., 2000).

De Savigny (1975) desenvolveu um método de cultivo de larvas de *T. canis in vitro*, possibilitando a produção de produtos antigênicos pelas larvas que poderiam ser detectados pelos anticorpos de um hospedeiro paratênico. A partir deste estudo, pesquisas foram conduzidas utilizando o antígeno de excreção e secreção de larvas de *T. canis* (TES) e o teste ELISA apresentou uma especificidade de 93% e uma reprodutibilidade de 85% em estudo de soroprevalência, quando o antígeno TES de diferentes laboratórios foi utilizando (Speiser & Gottstein, 1984). De acordo com Meghji & Maizels (1986) o seu perfil eletroforético do antígeno TES em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é composto por cinco frações proteicas principais (32, 55, 70, 120 e 400 kDa), sendo que as bandas mais proeminentes (32, 120 e 400 kDa) podem ser separadas em dois ou três componentes “closely migrating”.

Page et al. (1991) relataram que levantamentos sorológicos indicaram taxas de prevalência de 2% em adultos e acima de 15% em crianças na

Europa e América do Norte, enquanto que em regiões tropicais, a taxa variou de 60 a 80%. Segundo Auer & Aspöck (1996), na Europa Central a soroprevalência de adultos variou entre 1,4 a 3%, enquanto que em crianças, Tompson et al. (1986) relataram que pode atingir 20% em países desenvolvidos e 60% em países em desenvolvimento.

Na Nigéria, foi possível observar uma soroprevalência para anticorpos anti-*Toxocara* em 29,8% dos indivíduos analisados que tinham entre dois a 24 anos de idade e uma significativa associação a geofagia (Ajavi et al., 2000). Em Taiwan, a soropositividade de crianças de sete a 12 anos de uma tribo aborígene utilizando o ELISA, foi de 76,6%, sendo que o contato com cães, com solo e a ingestão de vegetais crus, foram identificados como os principais fatores de risco para a infecção (Fan et al., 2004).

Em Lima, Peru, foram analisadas amostras de soro de 740 homens e 238 mulheres com idade entre 16 e 83 anos, através do teste de ELISA, e em 7,33% delas havia anticorpos para *T. canis*, não havendo diferença significativa entre os sexos ou grupos de idade (Lescano et al., 1998). Enquanto que na Venezuela foram analisados, através de ELISA, soros de 73 crianças entre quatro a seis anos de idade e a prevalência média observada foi de 9,72%, sendo que em crianças de quatro anos os índices de positividade alcançaram 50%, referindo-se a geofagia e ao contato com cães como importante fator na transmissão da LMV (Garcia et al., 2001).

No Brasil, o primeiro caso com diagnóstico conclusivo de LMV foi realizado em 1980, através de biópsia hepática (Ferraz et al., 1980), sendo os estudos soroepidemiológicos iniciados por Chieffi (1984) no estado de São Paulo, quando foi determinada a frequência de anticorpos anti-*Toxocara*, através da técnica de ELISA, em 2025 amostras de soro de indivíduos de diferentes faixas etárias. Os resultados desse trabalho mostraram que 3,46% dos soros apresentaram anticorpos anti-*Toxocara*, sendo que a maior frequência de resultados positivos ocorreu entre os menores de 15 anos (6,41%) do que entre os demais (2,53%). Os maiores títulos foram observados em indivíduos que possuíam cães em suas residências.

Tundisi et al. (1995) avaliaram os soros de pacientes com suspeita clínica de LMV, no município de São Paulo, utilizando o antígeno TES e o teste de ELISA indireto, e observaram que 41,93% apresentaram-se positivos. Em

Vitória, ES, foram analisados soros de crianças internadas no hospital pediátrico de referência do Estado e o percentual de positividade para IgG anti-*T. canis* foi 39% (Moreira-Silva et al., 1998).

Uma preocupação constante em pesquisas de diagnóstico sorológico da LMV, é a presença de reações cruzadas com antígenos de outros helmintos causadores de doenças infecciosas no homem, como é o caso do *Ascaris lumbricoides* (Camargo et al., 1992; Nunes et al. 1997; Moreira-Silva et al., 1998). A adsorção de soros com extrato de *Ascaris* spp. aumentou a especificidade do diagnóstico, uma vez que este foi o principal responsável pela reatividade cruzada com o *T. canis* (Lynch et al., 1988). O extrato de *Ascaris suum* é muito usado para adsorver soros com suspeita de LMV, já que apresentou forte homologia com o *Ascaris lumbricoides* (Kennedy et al., 1987).

Num estudo com crianças em idade escolar desenvolvido na região de Butantã, São Paulo, utilizando soros adsorvidos com *Ascaris suum*, foi verificado que 38,8% de 399 escolares apresentaram anticorpos anti-*Toxocara* no ELISA utilizando o antígeno TES (Alderete et al., 2003).

Magnaval et al. (1991) compararam a utilização das técnicas de ELISA e "Western blotting" para o imunodiagnóstico da LMV e verificaram a existência de uma forte correlação entre os resultados de ambas. Propuseram que o "Western blotting" poderia ser aplicado para confirmar os resultados positivos no ELISA, uma vez que é mais específico, detecta bandas protéicas de baixo peso molecular entre 24 e 35 kDa e diminui os problemas de reação cruzada com antígenos de outros helmintos. A partir deste estudo, Park et al. (2002) visualizaram através de "Western blotting", bandas protéicas de baixo peso molecular - 24, 28, 30 e 35 kDa - e de alto peso molecular - 132, 147 e 200 kDa - reconhecidas por IgG em 4,5% de 314 amostras de soros de indivíduos adultos aparentemente saudáveis residentes na Coreia.

Em detrimento a reação cruzada entre antígenos de parasitos de espécies distintas, Nunes et al. (1997) utilizaram "Western blotting" para analisar os diferentes padrões de bandas entre soros adsorvidos e não adsorvidos com antígenos de *A. suum*, uma vez que a reação cruzada diminui a especificidade do teste. Estes autores verificaram que os soros positivos para LMV reconhecem várias bandas protéicas entre 29 e 205 kDa e que há pelo menos

uma proteína de 55-66 kDa responsável pela reação cruzada entre *T. canis* e *A. suum*.

Fan et al. (2004) verificaram através do “Western blotting” que glicoproteínas específicas de baixo peso molecular entre 30 e 35 kDa são reconhecidas por anticorpos IgG de soros de crianças positivas no ELISA Indireto utilizando o TES. No entanto, estes autores consideram que a pré-adsorção dos soros com antígenos de *A. suum* não é necessária, dada a especificidade do ELISA–TES no diagnóstico da toxocariose.

Discriminação das fases aguda e crônica

Na maioria das parasitoses é característica a presença de altos títulos de IgM no início da infecção, decrescendo com o decorrer do curso da doença. As IgGs são produzidas já na fase aguda e mostram-se altas por longos períodos. Em pacientes com LMV foram observados altos títulos de IgM, IgG e IgE (Despommier, 2003), sem distinção entre a fase aguda e crônica, pois tanto as IgMs como as IgGs permanecem por longos períodos. Assim, Bowman et al, (1987), observaram altos títulos de IgG e IgM em infecções experimentais de camundongos BALB/c com *T. canis*. Os autores verificaram que os níveis de IgM tiveram valores máximos na sexta semana pós-infecção, os níveis de IgG na décima semana pós-infecção e tanto a IgM como a IgG se conservou até o final do experimento, aos seis meses pós-infecção. Similarmente, Scaini (2001) verificou níveis máximos de IgM entre 50 e 70 dias pós-infecção e níveis máximos de IgG entre 70 e 90 dias pós-infecção, sendo que estes níveis permaneceram altos até o final do experimento.

A discriminação entre a fase aguda e crônica, é um fator relevante no diagnóstico e tratamento das infecções parasitárias. Em vista disso, muitos estudos foram conduzidos para estabelecer a percentagem de avidéz da IgG frente a antígenos de agentes infecciosos a fim de diferenciar a fase aguda e crônica de doenças. A determinação da avidéz de IgG representa um importante marcador sorológico, pois a baixa e a alta avidéz são encontradas predominantemente em infecções recentes e crônicas, respectivamente (Kneitz et al., 2004; Bertozzi et al., 1999). Segundo Werblin & Siskind (1972), a avidéz da IgG é baixa após o desafio antigênico primário, porém após algumas semanas ou meses de infecção, com a seleção de células B, os anticorpos IgG

pré-existentes a imunização e aqueles obtidos depois da resposta secundária exibiram uma alta avidéz pelo antígeno. Baseado nisso, recentemente uma variedade de ensaios imunoenzimáticos que detectam IgG vem sendo adaptados para estimar a avidéz de anticorpos em muitas doenças (Bertozzi et al., 1999).

O termo avidéz é usado para expressar o fortalecimento do vínculo entre uma molécula de anticorpo e um antígeno multivalente (Hubner, 2001). Baseado na característica que a uréia possui em dissociar ligações fracas entre antígeno-anticorpo, quando a avidéz entre estas duas moléculas é baixa, este elemento vem sendo utilizado no diagnóstico de doenças infecciosas, a fim de estabelecer as diferentes fases da doença (Bertozzi et al., 1999).

Pesquisas empregando a uréia como agente desnaturante foram primeiramente desenvolvidas para o diagnóstico da toxoplasmose, pois nesta doença, assim como ocorre na toxocariose, os níveis de IgM permanecem altos durante vários meses dificultando o diagnóstico da fase aguda e crônica (Hedman et al., 1989).

O primeiro estudo sobre a discriminação das fases aguda e crônica da LMV foi realizado na República Tcheca, com 1376 pacientes e somente 5,09% das amostras de soros analisadas apresentavam anticorpos com baixa avidéz, característica da fase aguda da doença, portanto esses indivíduos predominantemente estavam na fase crônica da doença (Hubner et al., 2001).

ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO À REVISTA: MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

3. ARTIGO 1 - SORODIAGNÓSTICO DA LARVA MIGRANS VISCERAL EM CRIANÇAS DA REGIÃO DE PELOTAS, RS

RESUMO

Para determinar a soroprevalência da LMV em crianças de um a 12 anos da região de Pelotas foi utilizado o teste de Enzyme linked immnosorbent assay (ELISA Indireto) com o antígeno de excreção e secreção de larvas de *Toxocara canis* (TES) e soros adsorvidos com antígeno somático de *Ascaris lumbricoides* (AgSoAl). O “Western blotting” foi realizado para identificar o padrão de bandas do antígeno reconhecidas pelos soros positivos no ELISA adsorvidos e não adsorvidos. De um total de 427 crianças, 50,6% apresentaram anticorpos anti-TES acima do ponto de corte estabelecido. Uma diferença significativa foi observada entre crianças soropositivas ao teste de ELISA e aquelas que tinham contato com cães e gatos e também crianças de diferentes grupos de idade, porém não houve diferença significativa quanto ao sexo das crianças soropositivas. Foram identificadas sete frações antigênicas do TES entre 30 e 120 kDa no “Western blotting” e os soros adsorvidos reconheceram com menor nitidez o mesmo padrão de bandas dos soros não adsorvidos. A fração de 30 kDa apresentou maior reatividade nos soros adsorvidos e provavelmente seja uma proteína importante para o diagnóstico específico da LMV.

SERUMDIAGNOSIS OF THE VISCERAL LARVA MIGRANS IN CHILDREN FROM PELOTAS, RS

ABSTRACT

To determine the serum prevalence of the VLM in groups of children with ages between 1 and 12 years of Pelotas, was performed the Indirect ELISA associate to the antigen TES with previous adsorption to AgSoAl. The "Western blotting" was accomplished to identify the pattern of bands of the antigen recognized by the positive serums in the ELISA adsorbed and no adsorbed. 427 serums of children were been tested and 50,6% presented antibodies anti-TES above the cut point established. A significant association was observed among children serum positives in the ELISA test and those that had contact with dogs and cats and among children of different age groups, however there was not significant difference as for the gender of the children serum positives. Were identified seven antigenic fractions of TES between 30 and 120 kDa in the "Western blotting", and the adsorbed serums recognized with smaller clearness the same pattern of bands of the non adsorbed. The fraction of 30 kDa presented larger reactivity and be probably an important glycoprotein for the specific diagnosis of VLM.

INTRODUÇÃO

A toxocarose humana é uma enfermidade zoonótica causada pela migração e persistência de larvas vivas do helminto *Toxocara* spp. em diversos tecidos corporais. Atualmente, pesquisas epidemiológicas desta doença têm sido desenvolvidas em diversas partes do mundo pois o cão é o principal disseminador de ovos de *T. canis* no ambiente (Oliveira-Cerqueira et al. 2004). Estudos realizados com crianças e adolescentes mostraram índices de soroprevalência da LMV de 37,9% na Argentina (Alonso et al. 2000), 76,6% em Taiwan (Fan et al. 2004), 38,8% em Butantã, São Paulo (Alderete et al. 2003) e 60% no Recife (Aguiar-Santos et al. 2004) e as condições sociais, culturais e ambientais em que os indivíduos estão inseridos pode ser relacionada aos fatores de risco a infecção por *T. canis* (Alderete et al. 2003).

O teste ELISA Indireto é o método mais utilizado em estudos epidemiológicos para analisar a soroprevalência, uma vez que apresentou uma sensibilidade de 100% e especificidade 90,5% quando associado ao antígeno TES (Camargo et al. 1992). O “Western blotting”, é um método utilizado para aumentar a especificidade do diagnóstico e determinar as frações protéicas do antígeno TES que são reconhecidas por anticorpos de soros com suspeita de toxocarose (Magnaival et al. 1991, Nunes et al. 1997). No entanto, reações cruzadas com antígenos de outros helmintos são bastante freqüentes (Lynch et al. 1988). Por isso, a adsorção prévia dos soros com extratos totais de parasitos é realizada a fim de aumentar a especificidade dos testes de imunodiagnóstico. As espécies do gênero *Ascaris* são as que apresentam maior reação cruzada com *T. canis* (Kennedy et al. 1987, Lynch et al. 1988) sendo *Ascaris suum* o ascarídeo mais utilizado em pesquisas de reação cruzada. Porém, *Ascaris lumbricoides* é comumente encontrado no intestino delgado de crianças e responsável por grande parte da reação cruzada com *T. canis* (Nunes et al. 1997). Por isso, a importância de utilizar este parasito na adsorção de soros humanos testados contra o antígeno TES.

Estudos de contaminação ambiental, conduzidos em Pelotas, sugerem a possibilidade desta doença estar presente de maneira significativa na região, não só devido as condições climáticas que propiciam o embrionamento dos

ovos de *Toxocara* no ambiente, como também devido a alta prevalência de cães errantes potencialmente parasitados que contaminam áreas de lazer e alimentos (Tavares 1999, Ferraz 2002). Entretanto, não se têm dados sobre a infecção do homem por LMV na região.

O presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência de anticorpos anti-*T. canis* em crianças entre um e 12 anos da região de Pelotas, RS, bem como determinar o padrão de bandas reconhecidas pelos soros positivos, após a adsorção com antígeno somático de *A. lumbricoides* (AgSoAl), considerando alguns fatores de risco predisponentes a Toxocarose humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção do Antígeno TES

Recuperação de formas adultas e incubação de ovos de *T. canis*

Os exemplares do parasito foram recuperados através da administração oral de pamoato de pirantel (15 mg/kg), em cães de quatro a oito semanas de idade infectados naturalmente por *T. canis*. Os parasitos foram lavados em PBS 0,15M, pH 7,2 (salina isotônica com tampão fosfato), e as fêmeas adultas submetidas a histerectomia para obtenção de ovos não embrionados. Para promover o desenvolvimento de larvas infectantes, os ovos foram incubados em formalina a 2%, a 28°C, sob aerações diárias, durante 28 dias.

Liberação, colheita e cultivo de larvas infectantes de *T. canis*

Conforme De Savigny (1975) e Maizels et al. (1991) foram empregadas metodologias para liberação e cultivo das larvas, com modificações. Após a incubação, os ovos embrionados foram lavados através de centrifugações de três minutos a 3.000 rpm, com PBS 0,15M, pH 7,2, para remoção da formalina. Em seguida, foram submetidos ao tratamento com solução de hipoclorito de sódio 5-6%, durante 10 a 15 minutos, promovendo a remoção da camada protéica e quitinosa dos ovos. Estes, foram lavados em PBS, através de centrifugações, para retirada do hipoclorito de sódio e sob condições assépticas submetidos à agitação mecânica lenta em Erlenmeyer, contendo pérolas de vidro e meio de cultivo RPMI 1640 a 37°C (suplementado com HEPES 25mM, Glicose a 1%, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml, ofloxacina 0,4 µg/ml e fungizona 50 µg/ml), durante 20 a 30 minutos, promovendo a ruptura da camada lipídica e a conseqüente liberação das larvas. Estas, foram colhidas em tubos estéreis e cultivadas em meio RPMI 1640 a 37°C e 5-8% de CO₂ por um período de até três meses.

Conservação e concentração do antígeno TES

O sobrenadante das culturas de larvas contendo os produtos de excreção e secreção, foi colhido semanalmente e filtrado através da membrana de 0,22µm (Millipore) para remoção das larvas eventualmente presentes (Page et

al. 1991). Após, este sobrenadante foi estocado a -20°C com o inibidor de protease PMSF 1mM (fluoreto de fenilmetilsulfonila). Depois de aproximadamente três meses de cultivo das larvas, todo o sobrenadante filtrado foi descongelado, misturado e concentrado por ultrafiltração a 4°C, através do “Stirred Cell” (Sigma), utilizando uma membrana PTGC (Sigma U-4005), com limite de exclusão de 10 kDa. A seguir, fez-se a diálise do material contra água deionizada (Milli-Q) a 4°C, durante 24 a 28 horas. Para obtenção do antígeno TES o material dialisado passou por uma liofilização primária, foi ressuspenso em água deionizada estéril e o antígeno estocado em alíquotas a -70°C.

Produção de antígeno Somático de *Ascaris lumbricoides* (AgSoAl)

As formas adultas de *A. lumbricoides* foram obtidas de crianças hospitalizadas na pediatria da Fundação de Apoio Universitário (FAU) da UFPel, que eliminaram espontaneamente este parasito. O antígeno somático do parasito foi produzido conforme a metodologia descrita por Berne (1994). As fêmeas adultas de *A. lumbricoides* foram lavadas em PBS 0,15M, pH 7,2, cortadas em pedaços pequenos e maceradas em gral e “Ten Broek” com tampão de extração (Tris, 10mM; EDTA, 1mM; CHAPS, 5mM; PMSF, 1mM; e Timerosal 1:10). Após, o macerado foi ultrassonicado durante um minuto a 40 hertz, por quatro vezes consecutivas com intervalos de 60 segundos. Realizou-se, em seguida, a centrifugação do material durante uma hora a 20.000 rpm e temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi dialisado contra PBS 0,15M, pH 7,2, durante 24 horas a 4°C. O material foi novamente centrifugado a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, e estocado em alíquotas a -70°C.

Determinação da concentração protéica dos antígenos

A concentração protéica dos antígenos produzidos foi determinada pelo método de Bradford (1976), modificado por Maizels et al. (1991), em placa de microtitulação a 570nm. As absorbâncias obtidas em diferentes concentrações de uma proteína conhecida (soroalbumina bovina) possibilitaram criar uma equação da reta no programa Excel (Microsoft) e com o cálculo desta, determinar as concentrações protéicas dos diferentes antígenos.

Eletroforese dos antígenos

Para determinar as frações protéicas dos antígenos foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) na concentração de 12%, em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 e gel de empilhamento na concentração de 5% em tampão Tris/HCl 1M, pH 6,8.

Cada antígeno foi ensaiado em canaleta separada no gel e com concentrações diferentes (20µg -TES, 30µg - AgSoAl) em tampão de amostra com condições redutoras (SDS a 10%, azul de bromofenol a 0,5%, Tris-HCl 0,25M pH 6,8, glicerol a 50% e β mercaptoetanol a 3%). A corrida eletroforética foi realizada em cuba "Mini Protean II" (Bio Rad), contendo tampão de corrida (Tris 0,025M, glicina 0,250M e SDS a 0,1%) e voltagem constante de 150V. O marcador de peso molecular de 10-220 kDa (Invitrogen- Bench Mark TM) foi utilizado para estimar o peso das frações dos antígenos através da visualização das bandas protéicas no gel corado com azul de Coomassie R-250.

Grupo de Amostragem

Foram utilizados para o estudo de epidemiologia, soros de 427 crianças com idade entre um e 12 anos residentes da região de Pelotas, cedidos pela soroteca do Centro de Controle de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária - UFPel.

Adsorção dos soros com AgSoAl

A adsorção dos soros com o AgSoAl foi realizada a fim de diminuir a ocorrência de reações cruzadas e remover anticorpos não-específicos para *T. canis*. Foram testadas diferentes concentrações do AgSoAl para a adsorção (20,3µg, 23,7µg, 27,2µg e 30,47µg). As amostras de soros do grupo de amostragem foram submetidas à agitação intermitente por uma hora a 37°C com o AgSoAl antes de ser confrontado com o antígeno TES já adsorvido na placa de ELISA.

Após, 427 soros foram adsorvidos com AgSoAl na concentração de 23,7µg/ml e ensaiados no teste ELISA Indireto. Os pontos de cortes foram

estabelecidos através da média das absorbâncias de 20 soros negativos no teste de ELISA para anticorpos anti-TES acrescidos de três desvios padrão.

Técnica de ELISA indireto

Para o teste ELISA indireto, a placa foi sensibilizada com 1µg/ml de antígeno TES em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6-9,8, por três horas, a 37°C. Os sítios livres para ligação de proteína foram bloqueados com PBS-caseína a 2%, durante uma hora, a 4°C e os soros controles positivos e negativos foram ensaiados, em duplicatas, na diluição de 1:100 em PBS pH 7,2, contendo Tween-20 a 0,05% (PBS-T). Tanto os soros, como o conjugado, foram incubados durante 45 minutos, a 37°C. Entre todas as fases do teste, as placas foram lavadas por três vezes de três minutos cada com PBS-T. Como cromógeno utilizou-se ortofenilenodiamina (OPD), na concentração de 0,4 mg/ml, em tampão citrato-fosfato pH 4,0, acrescida do substrato peróxido de hidrogênio a 0,1%. A leitura das absorbâncias foi realizada 15 minutos após a adição de OPD em leitor de ELISA e comprimento de onda de 450nm.

Os soros controles positivos utilizados neste experimento foram soros de crianças com suspeita de LMV que apresentavam eosinofilia, hepatomegalia, exame de fezes negativo para ovos e larvas de helmintos e oocistos e cistos de protozoários, e histórico de contato com cães. Estes soros foram inicialmente testados no ELISA Indireto e apresentaram absorbâncias altas de anticorpos IgG anti-TES. Como controle negativo foram utilizados soros de crianças que apresentaram absorbâncias negativas no teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-TES.

Técnica de “Western blotting”

Para determinar o padrão de bandas reconhecidas pelos anticorpos anti-TES foi empregada à técnica de “Western blotting” conforme metodologia descrita por Towbin et al. (1979) com modificações. Primeiramente, realizou-se a eletroforese dos antígenos em gel SDS-PAGE a 12%, conforme descrito anteriormente. A seguir, fez-se a eletrotransferência das proteínas para membrana de PVDF (Hybond-P) durante a noite utilizando uma voltagem de

40V e microamperagem máxima (400mA). Os locais livres de proteínas na membrana foram bloqueados com PBS caseína a 2%, durante uma hora.

A membrana foi aplicada a um sistema “mini-protean II multi screen” (Bio-Rad). Após, adicionaram-se os soros diluídos em PBS-T (1:50) positivos no ELISA Indireto, adsorvidos e não adsorvidos com AgSoAl. Incubou-se o sistema por uma hora a temperatura ambiente sob constante agitação. Posteriormente, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano ligado a peroxidase diluído em PBS-T (1:2000), e incubado novamente durante uma hora sob constante agitação a temperatura ambiente. Para leitura da reação, a membrana foi incubada com o cromógeno 4-chloro-1 naphthol, substrato peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCl pH 7,6 até surgimento das bandas. Foram utilizadas como controle da reação, tiras incubadas com soros negativos, positivos e somente conjugado e entre os diferentes passos do protocolo realizaram-se três lavagens de três minutos cada com PBS-T.

Estudo dos riscos de infecção

Junto ao Centro de Controle de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel foram obtidos os dados referentes à faixa etária, sexo e ao contato com cães e gatos da população analisada para que fosse realizado o estudo de fatores de risco.

Análise Estatística

Os dados foram computados no programa Epi Info Versão 6.0 (Deam et al. 1994). Foi usado o χ^2 de Mantel-Haenzul e “odds ratio” (OR) no intervalo de confiança de 95% para avaliar a soroprevalência da LMV em diferentes faixas etárias, sexo e presença ou ausência de contato com cães e gatos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cultivos de larvas provenientes dos ovos retirados das fêmeas de *T. canis*, originaram três partidas do antígeno TES, cujas concentrações protéicas foram de 1,3 μ g/ μ l, 1,06 μ g/ μ l e 0,99 μ g/ μ l. Em média, os ovos obtidos de cada 100 fêmeas do parasito constituíram um lote de cultivo e posteriormente uma partida do antígeno. O AgSoAl produzido a partir de duas fêmeas do parasito teve uma concentração protéica de 10,31 μ g/ μ l.

O perfil eletroforético do TES e do AgSoAl foi determinado utilizando gel de poliacrilamida SDS – PAGE 12%. Na **Figura 1**, observa-se a diversidade de frações protéicas dos antígenos produzidos. O antígeno TES apresentou várias frações de glicoproteínas entre 10 e 220 kDa, sendo três mais evidentes com aproximadamente 30 e 70 e 120 kDa e algumas menos evidentes entre 25 e 35 kDa, 41 e 53 kDa e entre 60 e 70 kDa. O AgSoAl apresentou um maior número de frações de peso molecular entre 10 e 220 kDa, uma característica esperada, pois este antígeno foi produzido a partir do extrato total do parasito.

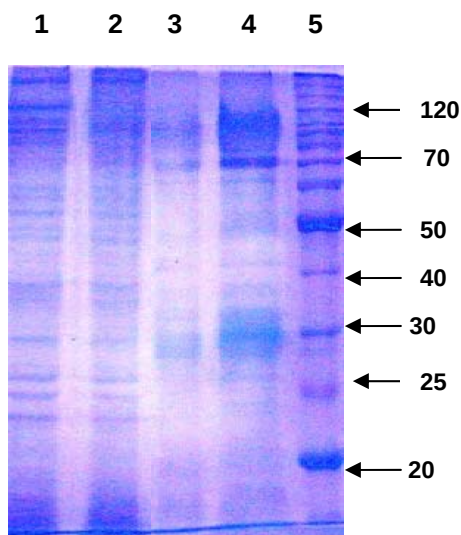


FIGURA 1 - Perfil eletroforético dos antígenos: AgSoAl – 30 μ g (1), 15 μ g (2); TES – 15 μ g (3), 20 μ g (4); marcador de peso molecular (10 –220 kDa, Invitrogen- Bench Mark TM) (5).

A semelhança do perfil eletroforético encontrado neste experimento aquela observada por Scaini (2001) confirmam a reprodutibilidade do TES já

que ambos antígenos foram produzidos sob as mesmas condições em nosso laboratório. Este autor verificou cinco frações principais do TES (33, 53, 69, 98 e 116 kDa) e três de menor intensidade (29, 41 e 62 kDa) em gel SDS-PAGE (12,5%). Meghji & Maizels (1986) que observaram cinco frações proteicas principais do TES (32, 55, 70, 120 e 400 kDa) em gel de gradiente (5-25%) SDS-PAGE. Boyce et al. (1988), observaram quatro frações proteicas entre 30 e 92 kDa e Speiser & Gottstein (1984) distinguiram frações protéicas do TES com peso molecular entre 30 e 116 kDa. De acordo com estes últimos, o número e o padrão de peso molecular das bandas pode mostrar diferenças qualitativas e quantitativas em antígenos provenientes de laboratórios distintos, porém mostraram boa especificidade e reprodutibilidade ao ELISA quando utilizaram o TES.

Embora vários helmintos apresentem reação cruzada com TES, esta é mais evidente com espécies de *Ascaris* spp. (Kennedy et al. 1987), pois são nematódeos da mesma família e filogeneticamente próximos. Portanto, mesmo tendo como hospedeiros definitivos indivíduos de espécies diferentes, apresentam determinantes antigênicos comuns.

Vários autores utilizaram antígenos de *A. suum* para adsorver soros humanos, em levantamentos epidemiológicos da LMV (Moreira –Silva et al. 1998, Camargo et al. 1992, Nunes et al. 1997), devido a forte homologia entre este e *Ascaris lumbricoides* (Kennedy et al. 1987). No entanto, no presente estudo, optou-se por realizar a adsorção com extrato de *A. lumbricoides*, por ser este parasito específico do homem, bem como pela alta prevalência deste nematódeo em crianças da região em estudo (Villela et al. 2003).

Na análise pelo ELISA Indireto dos soros de 427 crianças, 50,6% (216) foram positivas para anticorpos anti-TES, sendo que destas 61,6% (133) eram do sexo masculino e 38,4% (83) do sexo feminino. O ponto de corte estabelecido através da média da absorbância de 20 soros negativos no ELISA Indireto acrescido de três desvios padrão foi de 0,270. Na **Tabela 1** é possível visualizar o número de amostras positivas e negativas para anticorpos anti-*T. canis* de acordo com o sexo, idade e contato com cães e gatos, assim como a frequência de associação das diferentes variáveis analisadas. Segundo Glickman & Schantz (1981), a alta soropositividade indica que as crianças

entraram em contato alguma vez com o agente etiológico, já que os anticorpos podem persistir por muitos anos depois da infecção inicial.

A alta prevalência de anticorpos anti-*T. canis*, detectada nos soros de crianças, está relacionada com a contaminação ambiental registrada em solos de praças públicas, praias e parques da região (Tavares 1999, Ferraz 2002). Assim, também Radman et al. (2000), observaram uma soropositividade de 39% de anticorpos anti-*T. canis* em crianças da cidade de La Plata, onde havia contaminação ambiental por ovos de *T. canis*.

Estudos semelhantes foram realizados na região de Vitória, ES, onde foi observado que 39% das amostras analisadas de crianças de um a 14 anos apresentavam-se sorologicamente positivas (Moreira-Silva et al. 1998). Também em trabalho com crianças da mesma faixa etária Alonso et al. (2000), verificaram uma positividade para LMV em 37,9% dos soros. Da mesma forma, a soroprevalência de crianças de sete a 16 anos da região de Butantã utilizando ELISA Indireto foi de 38,8%. Estes últimos observaram que o fator sócio econômico, hábitos de onicofagia e as condições higiênicas das residências estavam intimamente ligadas a soropositividade (Alderete et al. 2003).

Em Brasília, Campos Junior et al. (2003) avaliaram a soroprevalência de crianças de um a 12 anos de diferentes classes sociais, com adsorção ao *Ascaris suum* e determinaram que 21,8% das crianças da classe pobre tinham anticorpos anti TES. Na Nigéria, Ajayi et al. (2000), observaram prevalências de 29,8%. Os autores discutem que, a análise de indivíduos com idade entre dois e 24 anos deve ter subestimado os resultados positivos de crianças mais sujeitas à infecção. Um estudo mais recente, realizado com crianças de uma tribo aborígene em Taiwan resultou em uma soropositividade de 76,6% dos indivíduos (Fan et al. 2004). Estes autores ressaltam que o contato das crianças com cães e ambientes contaminados tornam-nas mais suscetíveis à contaminação.

A divergência dos percentuais de indivíduos positivos para anticorpos anti-TES entre este estudo e os demais, provavelmente deva-se ao grau de exposição das populações analisadas a ambientes contaminados e as variações dos métodos imunológicos estabelecidos para o diagnóstico.

Embora o contato com gatos não seja citado em grande parte dos estudos de soropidemiologia da LMV, sabe-se que estes animais representam um importante papel na epidemiologia da doença (Despommier 2003). O contato com estes, representou um fator de risco significativo para a infecção da população analisada neste trabalho, uma vez que as razões de chances de uma criança que estabelece contato com gatos ser positiva para anticorpos anti-TES foram de 2,24 (**Tabela 1**).

Também o contato com cães foi um fator de risco significativo para a infecção das crianças e a razão de chances estabelecida pelo contato com este animal foi 1,70 (**Tabela 1**). Concordando com isso, Fan et al. (2004), observaram uma significativa associação entre o contato com cães e a infecção por *T. canis* em crianças aborígenes. No entanto, segundo Ajayi et al. (2000), a presença de cães como animais de estimação não esteve correlacionada diretamente com a soroprevalência humana da LMV, pois indivíduos que entram ou não em contato com cães, possuem o mesmo risco de adquirirem a infecção. Porém, devido à alta densidade de ovos embrionados presentes no corpo destes animais, o contato direto que as pessoas estabelecem com os cães, pode levar a infecção das mesmas (Wolfe & Wrigth 2003).

Mesmo que os meninos tenham apresentado um maior percentual de soropositividade ao TES, não houve diferença significativa entre o sexo das crianças soropositivas (**Tabela 1**). Resultados semelhantes a este também foram observados em estudos similares na Nigéria, Argentina, Taiwan e em outras regiões do Brasil (Ajayi et al. 2000, Alonso et al. 2000, Fan et al. 2004, Alderete et al. 2003, Moreira-Silva et al. 1998). A predominância da infecção em crianças do sexo masculino, parece ser devido a diferenças sociais de comportamento, que os tornam mais expostos aos ovos de *Toxocara* (Overgaauw 1997), porém este não chega a ser um fator epidemiológico significativo.

A idade das crianças, no entanto, mostrou uma significativa associação com a soropositividade para anticorpos anti-*T. canis*. A razão de chances de crianças entre dois e doze anos serem soropositivas foi 10,42 vezes maior que crianças de apenas um ano. Este valor diminui para 4,10 quando comparamos crianças de três a doze anos com aquelas entre um e dois anos, para 2,56 ao comparar crianças de quatro a doze com crianças entre um e três anos e para

2,27 quando se comparam crianças de cinco e 12 anos e aquelas entre um e quatro anos. A razão de chance de crianças soropositivas de seis a 12 anos é 2,05 vezes maior que aquelas entre um e cinco, ao mesmo tempo em que aquelas que possuem de sete a doze anos tiveram 1,65 vez mais chances de serem soropositivas que crianças entre um a seis anos. Assim, a razão de chance diminui à medida que dois grupos etários se dividem, porém somente até os sete anos é estatisticamente significativa, sugerindo que crianças em idade escolar têm maior contato com ambientes contaminados e por isso estão mais sujeitas à infecção por *T. canis* que aquelas que ainda não chegaram nesta idade. **(Tabela 1).**

TABELA 1 - Fatores de risco associados com a soropositividade de anticorpos IgG anti-*T. canis* em crianças da região de Pelotas

Variável	Grupo	Nº positivo	Nº negativo	Total	ORs (95% IC)	P
Sexo	Masculino	133	113	246	1,00 (referência)	
	Feminino	83	98	181	1,39 (0,92 – 20,9)	0,093623
Idade	1	3	27	30	1,00 (referência)	
	2	9	14	23	10,42 (2,92-44,33)	0,000004
	3	20	24	44	4,10 (1,99 – 8,59)	0,000013
	4	22	26	48	2,56 (1,54 – 4,26)	0,000080
	5	21	19	40	2,27 (1,47 – 3,52)	0,000076
	6	25	14	39	2,05 (1,36 – 3,09)	0,000282
	7	21	14	35	1,65 (1,10 – 2,48)	0,009878
	8	27	22	49	1,48 (0,98 – 2,25)	0,047185
	9	29	20	49	1,44 (0,92 – 2,27)	0,092061
	10	16	14	30	1,28 (0,74 – 2,22)	0,347909
	11	8	10	18	1,36 (0,67 – 2,78)	0,358212
	12	15	7	22	2,17 (0,80 – 6,08)	0,090679
Contato com gatos	Presente	65	34	99	1,00 (referência)	
	Ausente	151	177	328	2,24 (1,36 – 3,70)	0,000621
Contato com cães	Presente	164	137	301	1,00 (referência)	
	Ausente	52	74	126	1,70 (1,09 – 2,67)	0,012735

I.C. = intervalo de confiança de 95%,
O.R. = Razão de chances,
p = probabilidade

Porém, em estudos semelhantes a este não foram verificadas diferenças significativas na prevalência da LMV entre crianças de 1 a 14 anos (Alonso et al. 2000, Moreira– Silva et al. 1998, Campos Junior et al. 2003), nem mesmo entre crianças em idade escolar (Alderete et al. 2003, Fan et al. 2004). Entretanto, quando foram analisadas amostras de uma população com faixa etária mais ampla, foi verificada maior freqüência de soropositividade em crianças menores de 15 anos que os indivíduos acima desta idade (Radman et al. 2000). Portanto, são necessários estudos subseqüentes que avaliem a prevalência da LMV em crianças de faixas etárias distintas, utilizando-se um número homogêneo de indivíduos para cada faixa etária analisada.

Setenta soros positivos no ELISA Indireto (com absorbâncias entre 0,899 e 2,054) foram analisados no “Western blotting” frente ao antígeno TES. Na **Figura 2** observa-se o padrão de bandas detectadas por 15 soros positivos no ELISA, sendo sete frações do antígeno predominantemente reconhecidas pelos anticorpos (30, 40, 45, 50, 70, 98 e 116 kDa).



FIGURA 2 - Padrão de bandas do antígeno TES no “Western blotting” reconhecidas por soros humanos positivos no ELISA Indireto (1-15), controle positivo (16) e controle negativo (17) .

Também Magnaval et al. (1991) identificaram sete bandas reativas ao TES através de “Western blotting”, sendo quatro de baixo peso molecular (24, 28, 30 e 35 kDa) e três de alto peso molecular (132, 147 e 200). Estes autores apesar

de observarem uma boa correlação entre os resultados obtidos no ELISA Indireto e no “Western blotting”, identificaram uma pequena discrepância de resultados, sugerindo ser devido à reação cruzada com outros helmintos, já que não realizaram adsorção dos soros com extratos de outros parasitos do homem. Esta discrepância não foi observada no presente trabalho, uma vez que todos os soros positivos no ELISA reconheceram o mesmo padrão de bandas no “Western blotting”. Semelhantemente, Park et al. (2001), observaram resultados bastante próximos para soroprevalência humana da LMV utilizando ELISA Indireto e “Western blotting”.

Frações protéicas reconhecidas por anticorpos IgG anti-TES semelhantes às identificadas neste experimento também foram determinadas por Nunes et al. (1997), que ao utilizarem gel de gradiente 5-15% SDS-PAGE observaram bandas entre 29 e 205 kDa em “Western blotting” de pacientes com suspeita de LMV, e por Fan et al. (2004) que determinaram que soros de crianças positivos ao ELISA foram reativos principalmente com bandas de 30 e 35 kDa do TES.

Na análise através do “Western blotting” de 32 soros positivos para o TES frente ao AgSoAl, foi verificada uma reação de menor intensidade com frações proteicas de 30 e entre 40 e 60 kDa e uma reação mais evidente foi detectada com uma fração de 70 kDa (**Figura 3**). Assim, resultados semelhantes foram observados por Scaini (2001), ao verificar que anticorpos monoclonais anti-*T. canis* reagiram contra bandas de 29, 48, 65 e 72 kDa do Antígeno somático de *A. suum*.

Quando soros positivos ao ELISA, adsorvidos e não adsorvidos com AgSoAl, foram avaliados no “Western blotting” utilizando TES, foi observado que uma menor intensidade na reação ocorreu com os soros adsorvidos e a banda de 30 kDa foi aquela mais evidente após a adsorção, sugerindo ser esta uma fração específica para o TES (**Figura 4**). Também se observa a menor intensidade da reação quando os soros foram adsorvidos com o AgSoAl.

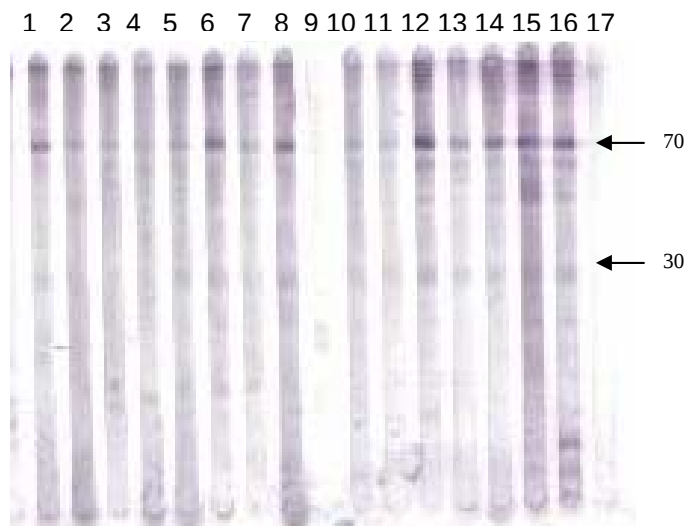


FIGURA 3 - Padrão de bandas do AgSoAl no “Western blotting” reconhecidas por soros humanos positivos no ELISA Indireto (1-8 e 10-15), controle positivo (16) e controles negativos (9 e 17) .



FIGURA 4 - Padrão de bandas do TES no “Western blotting” reconhecidos por soros humanos positivos no ELISA-TES não adsorvidos (1, 3, 5, 7, 9, 11) e adsorvidos (2, 4, 6, 8, 10, 12) com AgSoAl, controle positivo (13-14) e negativo (16-17) não adsorvidos e adsorvidos, respectivamente.

Segundo Lynch et al. (1988), bandas de 81 kDa e 44 kDa são responsáveis pela reação cruzada entre o TES e antígenos de *Ascaris* spp. Para Nunes et al. (1997), uma fração de peso molecular entre 55-66 kDa e outras quatro com peso molecular maior que 205 kDa parecem ser

responsáveis pela reatividade cruzada entre o TES e *Ascaris* spp. pois as bandas de baixo peso molecular mostraram reatividade cruzada com antígenos de *A. suum*. No entanto, outros autores observaram que frações de menor peso molecular entre 24 e 35 kDa são mais específicas para o gênero *Toxocara* enquanto que frações de alto peso molecular de 132, 147 e 200 kDa são mais passíveis de reação cruzada, (Magnaval et al. 1991, Park et al. 2001, Fan et al. 2004).

Os resultados de nossa pesquisa apontam uma fração protéica de 30 kDa do antígeno TES, identificada como importante para o diagnóstico específico da LMV. Além disso, determinam a alta prevalência de anticorpos anti-TES na região estudada e o contato com cães e gatos como fator de risco associado a esta prevalência. No entanto, é necessário associar os resultados dos métodos imunoenzimáticos aos sintomas e sinais clínicos do paciente, fatores de risco e demais métodos laboratoriais para definir um diagnóstico preciso da doença, uma vez que os resultados de estudos de soropositividade variam em decorrência dos ensaios adotados, definição dos pontos de corte, variações de componentes e métodos e a padronização dos métodos imunoenzimáticos (Alderete et al. 2003). Além disso, medidas preventivas de saúde pública como o controle de acesso a lugares públicos por animais, o tratamento aos infectados e a educação e higiene da população são sempre recomendadas (Giacometti et al. 2000).

REFERÊNCIAS

- Aguiar-Santos AM, Andrade LD, Medeiros Z, Chieffi PP, Lescano SZ, Perez EP 2004. Human toxocariasis: frequency of anti-Toxocara antibodies in children and adolescents from an outpatient clinic for lymphatic filariasis in Recife, northeast Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46: 81-85.
- Ajayí OO, Duhlińska SM, Agwale SM, Njoku M 2000 Frequency of human Toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 147-149.
- Alderete JMS, Jacob CMA, Pastorino AC, Elefant GR, Castro APM, Fomin ABF, Chieffi PP 2003. Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butantã region, São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 593-597.
- Alonso JM, Bojanich MVI, Chamorro M, Gorodner, JO 2000 *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 42: 235-237.
- Berne MEA 1994 Identificação e purificação de antígenos somáticos de formas adultas de *Fasciola hepática* através de anticorpos monoclonais: ensaios de imunoproteção e imunodiagnóstico. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais 168f.
- Boyce WM, Branstetter BA, Kazacos KR 1998. Comparative analysis of larval excretory-secretory antigens of *Baylisascaris procyonis*, *Toxocara canis* and *Ascaris suum* by western blotting and enzyme immunoassay. *International Journal for Parasitology* 18: 109-113.
- Bradford M 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Camargo ED, Nakamura PM, Vaz AJ, Silva MV, Chieffi PP, Melo EO 1992 Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 34: 55-60.
- Campos Júnior D, Elefante GR, Silva EOM, Gandolfi L, Abe Jacob CM, Tofete A, Pratesi R 2003. Frequência de soropositividade para antígenos de *Toxocara canis* em crianças de classes sociais diferentes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 36: 509-513.
- De Savigny DH 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. *Journal of Parasitology* 61: 781-782.

Deam AG, Deam JA, Coulmolin D, Brendel KA, Smither DC, Burton AH, Dicher RC, Sullivan K, Fagan RF, Arnor TJ 1994. Epi Info Version 6.0. A word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Center for Disease Control and Prevention Atlanta, G.A.

Despommier D 2003. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 265-272.

Fan CK, Hung CC, Du WY, Liao CW, Su KE 2004. Seroepidemiology of *Toxocaracanis* infection among mountain aboriginal schoolchildren living in contaminated districts in eastern Taiwan. *Tropical Medicine and International Health* 9: 1312-1318.

Ferraz ML 2002. Contaminação da areia por ovos e larvas de helmintos e oocistos de protozoários na praia do laranjal (Monografia) – Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, 45f.

Giacometti A, Cirioni O, Fortuna M, Osimani P, Antonicelli L, Del Prete MS, Riva A, D'errico MM, Petrelli E, Scalise G 2000. Environmental and serological evidence for the presense of toxocariasis in the urban area of Ancona, Italy. *European Journal of Epidemiology* 16: 1023-1026.

Glickman LT, Schantz PM 1981 Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiology Reviews* 3: 230-250.

Kaplan M, Kalkan A, Hosoglu S, Kuk S, Ozden M, Demirdad K, Ozdarendeli 2004. The frequency of *Toxocara* infection in mental retarded children. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 121-125.

Kennedy MW, Qureshi F, Haswaell-Elkins M, Elkins DB 1987. Homology and heterology between secreted antigens of the parasitic larval stages of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *Clinical experimental Immunology* 67: 20-30.

Lynch NR, Wilkens LK, Hodgen AN, Turner, KJ 1998. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Parasite Immunology* 10: 323-337.

Magnaval JF, Fabre R, Maurieres P, Charlet JP, de Larrard, B 1991. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology Research* 77: 697-702.

Mailzels RM, Blatex ML, Robertson BD Selkirk ME 1991 Parasite antigens, parasite genes. A laboratory manual for molecular parasitology. Cambridge: Cambridge University Press, 224 p.

Meighji M, Maizels RM 1986. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 18: 155-170.

Morales OL, Lopez MC, Nicbolls RS, Agudelo C 2002. Identification of *Toxocara canis* antigens by western blot in experimentally infected rabbits. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 44: 213-216.

Moreira-Silva SF, Leão ME, Mendonça HFS, Pereira FEL 1998. Prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in a random sample of in patients at a children's hospital in Vitória, Espírito Santo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 40: 259-261.

Nunes CM, Tundisi RN, Garcia JF, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ 1997. Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by Western blotting technique. *Revista do Instituto de Medicina Tropical da São Paulo* 39: 253-256.

Oliveira-Serqueira TCG, Amarante AFT, Ferrari TB, Nunes LC 2002. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology* 103: 19-27.

Overgaauw PA 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocarosis. *Critical Reviews in Microbiology* 23: 215-231.

Page AP, Richards DT, Lewis JW, Omara HM, Mailzels RM 1991. Comparison of isolates and species of *Toxocara canis* by biosynthetic labeling of somatic and ES proteins from infective larvae. *Parasitology* 103: 451-464.

Park HY, Lee SU, Huh S, Kong Y, Magnaval JF 2002. A seroepidemiological survey for toxocariasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 40: 113-117.

Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M, Linzitto OR 2000. Human Toxocariasis. Its soroprevalence in the city of La Plata. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 201-205

Scaini CJ 2001. Produção de anticorpos monoclonais anti-antígeno de excreção e secreção de larvas de *Toxocara canis* e cinetica da produção de anticorpos anti- *T. canis* em camundongos BALB/c infectados experimentalmente. Tese (Doutorado) Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas 72f.

Speiser F, Gottstein B 1984. A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Tropica* 41: 361-372.

Tavares ALC 1999 Contaminação do solo por ovos de helmintos e oocistos de protozoários nas praças de conjuntos habitacionais verticais de Pelotas, RS, Brasil. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas 62f.

Towbin H, Staehelin T, Gordon G 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet:s: procedure and some applications.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76: 4350-4354.

Villela MM, Moura NO, Homsy SR, Ferreira RC, Moura A, Vargas EJ, Berne MEA 2003. Prevalência de parasitos intestinais diagnosticados no UFPel – Lab (Pelotas, RS, Brasil), referentes a um ano de análises. Laes & Haes, 141: 120-128.

Wolfe A & Wright IP 2003. Human toxocariasis and direct contact with dogs. Veterinary Record 152: 419-422.

**ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO À REVISTA DO INSTITUTO DE
MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO**

**4. ARTIGO 2 - DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DA IgG EM CAMUNDONGOS
BALB/c INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *T. canis***

RESUMO

Para discriminar a infecção crônica da infecção aguda da LMV, foram colhidas quinzenalmente amostras de sangue de 25 camundongos BALB/c infectados com 1000 ovos de *Toxocara canis*. Os soros foram ensaiados no ELISA Indireto utilizando uréia 6M e o percentual de avidéz da IgG determinado a partir da média das absorbâncias dos soros tratados com uréia dividida pela média da absorbância dos soros não tratados. Um baixo percentual de avidéz da IgG (entre 7,25 e 27,5%), característico da infecção aguda, foi observado aos 15 dias pós-inoculação e após 60 dias de infecção, todos os camundongos apresentaram avidéz entre 31,4 e 58% e uma provável infecção crônica da LMV já estabelecida.

DETERMINATION OF THE AVIDITY OF IgG IN BALB/c MICE EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *T. canis*

ABSTRACT

To discriminate the chronic and acute infection of VLMV, 25 BALB/c mice were infected with 1000 eggs of *Toxocara canis* containing the infecting larva (L₃) and each 15 days blood samples were collected from the animals. The serums were tested in Indirect ELISA using urea 6M and the percentile of avidity of the IgG witch was determinate from the average of the absorbancies of the serums treated with urea divided by the average of the absorbancies of the serums no treated. A low percentile of avidity was observed to the 15 days after inoculation (between 7,25 and 27,5%). After 60 days of infection, all the animals presented avidity between 31,4 and 58%. This result suggests that in BALB/c mice, to the 60 days after infection the chronic phase of VLM is already established.

INTRODUÇÃO

A larva migrans visceral foi registrada pela primeira vez em 1952⁴. Esta síndrome, acomete principalmente crianças que possuem hábitos de geofagia, onicofagia, poucas condições higiênicas e contato com ambientes contaminados por fezes de cães e gatos, que albergam no seu intestino o helminto *Toxocara canis*^{1,2}, principal agente causador da doença.

Devido a inespecificidade dos sinais e sintomas, o diagnóstico clínico da doença é difícil e os métodos imunológicos tornam-se necessários, já que entre os indicadores da infecção está a hipergamaglobulinemia principalmente de IgG, IgM e IgE⁹.

Entretanto, não é possível determinar em que fase da doença o indivíduo infectado encontra-se, uma vez que a IgM, geralmente, característica da infecção aguda de doenças infecciosas, pode permanecer com altos títulos durante um longo período de infecção^{6 12 25}. Identificar se o índice de infecção por larvas de *T. canis* determina o nível de anticorpos circulantes anti-*T. canis* bem como a sua duração¹² ou se estes fatores se devem à resposta imunológica individual dos hospedeiros²⁵ pode contribuir para discriminar a fase da doença, importante para o diagnóstico e tratamento da LMV¹⁸.

A determinação da avidéz da IgG durante a infecção, tem contribuído para discriminar as diferentes fases de doenças infecciosas^{14 16}. O termo avidéz é usado para expressar o fortalecimento do vínculo entre os anticorpos do soro e o antígeno multivalente¹³, e a avidéz da IgG representa um importante marcador sorológico, pois a baixa e a alta avidéz são encontradas predominantemente em infecções recentes e crônicas, respectivamente⁵.

Estudos utilizando o teste imunoenzimático de ELISA e a uréia, vêm sendo realizados para medir a avidéz da IgG e discriminar a fase aguda e crônica em infecções com *Toxoplasma gondii*^{17 24}, pois a uréia possui uma propriedade desnaturante responsável pela dissociação da interação antígeno-anticorpo, quando a avidéz entre estas duas moléculas é baixa⁵.

Estudos para discriminar as fases aguda e crônica da LMV utilizando a avidéz da IgG, foram inicialmente realizados na República Tcheca^{13 11} e de acordo com estes autores a infecção aguda foi constatada, respectivamente, em apenas 5,09 e 6,5% dos indivíduos analisados.

Diante disso, neste trabalho foi investigada a relação dos níveis de IgG anti-TES aos 105 dias pós-inoculação com a presença de larvas no encéfalo de camundongos BALB/c infectados experimentalmente e a aplicabilidade de um ELISA Indireto para discriminar as fases de infecção da LMV utilizando uréia para romper as ligações fracas entre antígeno-anticorpo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos parasitos e produção do antígeno TES

A recuperação de formas adultas de *Toxocara canis* foi realizada através da administração de pamoato de pirantel (15mg/kg) em cães de quatro a oito semanas de idade. Os ovos obtidos através de histerectomia de fêmeas foram incubados em formalina a 2% e submetidos a uma temperatura de 28°C, sob aerações diárias, durante 28 dias, para permitir o desenvolvimento embrionário.

Inicialmente, as larvas infectantes foram liberadas do interior dos ovos de *T. canis*⁸. Os ovos foram lavados através de sucessivas centrifugações com salina isotônica com tampão fosfato (PBS) 0,15M pH 7,2, e submetidos ao tratamento com solução de hipoclorito de sódio 5-6%, durante 10 a 15 minutos, para a remoção das camadas protéica e quitinosa. Novamente, os ovos foram submetidos a lavagens com PBS 0,15M para retirada do hipoclorito de sódio e, sob condições assépticas, submetidos à agitação mecânica lenta em Erlenmeyer com pérolas de vidro e meio RPMI 1640 a 37°C (contendo HEPES 25Mm, Glicose 1%, penicilina 100U/ml, estreptomicina 100g/ml, ofloxacina 40g/ml e fungizona 2,5g/ml). As larvas foram cultivadas em meio RPMI 1640, a 37°C e 5-6% de CO₂.

O sobrenadante colhido semanalmente dos cultivos, foi filtrado em membrana filtrante (Míllipore) de 0,22µm²² e estocado a -20°C com inibidor de protease (1mM de PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila)²⁰. Após, o material estocado foi misturado, concentrado por ultrafiltração (Sigma Stirred Cell - 10KDa), dialisado contra água ultrapura (Milli-Q) a 4°C durante 24 horas e posteriormente liofilizado, obtendo-se deste modo o extrato antigênico de excreção e secreção (TES), que foi resuspenso em água ultrapura e conservado em alíquotas a -70°C.

A dosagem de proteínas do antígeno TES foi determinada utilizando o método de Bradford modificado⁷.

Camundongos BALB/c

Foram utilizados no experimento 25 camundongos BALB/c de oito semanas de idade, mantidos na sala de experimentação do biotério central da

Universidade Federal de Pelotas (UFPel) durante toda a fase experimental do trabalho.

Inoculação com ovos de *T.canis* e colheita de sangue

Inicialmente, procedeu-se a colheita de sangue dos 25 animais no dia considerado como dia zero ou no dia anterior à inoculação. A seguir, cada um destes camundongos foi inoculado com 1000 ovos de *T. canis* contendo a larva infectante (L₃), utilizando sonda intragástrica. Após, realizou-se colheitas de sangue aos 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias pós-inoculação para que fossem avaliados os níveis de anticorpos anti-TES nas diferentes fases da doença. As colheitas de sangue foram realizadas pelo plexo venoso retro-orbitário com auxílio de pipetas de Pauster, sob efeito de anestesia com éter etílico.

Teste de ELISA indireto

Os soros dos camundongos nos diferentes dias pós-inoculação foram ensaiados em duplicatas no ELISA Indireto e submetidos aos dois tipos de situações (ELISA com tratamento e sem tratamento com uréia). A uréia foi um componente do tampão PBS-T (PBS contendo Tween-20) utilizado na lavagem das placas. Diferentes concentrações de uréia (4M, 5M e 6M), tempos de lavagens das placas (um, dois e três minutos) e número de lavagens (uma, duas e três vezes), foram testados na padronização da técnica.

O ELISA Indireto foi realizado utilizando para sensibilizar a placa o antígeno TES (1µg/ml) em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6-9,8, por três horas, a 37°C, seguido do bloqueio por uma hora com PBS caseína a 2% e adição dos soros dos animais inoculados (1:50) em PBS-T por 45 minutos. A seguir, foi feita uma lavagem com PBS-T contendo ou não uréia e adicionado o conjugado (Ig total de coelho anti-camundongo ligado a peroxidase na diluição de 1:2000). Como substrato foi utilizado OPD (ortofenilenodiamina), na concentração de 0,4 mg/ml, em tampão citrato-fosfato pH 4,0, acrescido do substrato (peróxido de hidrogênio a 0,1%). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (450nm).

Cálculo determinante da avidéz da IgG

O cálculo da avidéz da IgG foi determinado através da média aritmética das absorbâncias obtidas no teste de ELISA Indireto com os soros tratados com uréia dividida pela média das absorbâncias obtidas com os soros não tratados e expressa em percentagem⁵.

Sacrifício dos animais

No final do experimento, aos 105 dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados através do deslocamento da coluna cervical a fim de verificar a presença de larvas de *T. canis* no tecido encefálico. Para isso os encéfalos foram retirados e analisados ao microscópio óptico em lâminas de vidro sobrepostas¹⁵.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados no programa Statistix 8²⁷. A investigação da associação entre o número de larvas de *T. canis* recuperadas do encéfalo dos camundongos e absorbâncias no ELISA Indireto foi realizada através de regressão linear simples. Para comparar as absorbâncias dos soros tratados ou não com uréia nos diferentes dias após a inoculação, foi utilizada análise de variância com medidas repetidas e comparação de médias através do “Least Significant Difference” (LSD).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de larvas de *T. canis* 105 dias após a infecção experimental dos camundongos, bem como as absorbâncias dos soros do ELISA Indireto frente ao TES podem ser observadas na **Tabela 1**. No exame do tecido encefálico dos animais, um número mínimo de quatro e máximo de 84 larvas foram recuperadas. Esta variação, possivelmente possa ser decorrente da persistência das larvas em outros tecidos que não no encéfalo pois além deste, também a musculatura são órgãos em que ocorre uma importante deposição larval^{10 25 28}, ou ainda devido à destruição das larvas pelo sistema imunológico dos hospedeiros, durante a sua migração.

De acordo com a análise de regressão linear (absorbância = $0,5608 + 0,00106 \times \text{número de larvas}$), nenhuma associação entre o número de larvas recuperadas no encéfalo dos camundongos e a produção de anticorpos IgG aos 105 dias pós-inoculação foi observada (**Tabela 1**). Em estudo semelhante com camundongos experimentalmente infectados com 1000 larvas de *T. canis* via intra-peritoneal não houve associação entre o índice de infecção em diferentes órgãos, musculatura estriada e os níveis de anticorpos ao final do experimento. Segundo o autor, isso se deve a resposta imunológica individual dos animais²⁵. O encéfalo representa um refúgio às respostas imunológicas do hospedeiro e as larvas vivas migram para o encéfalo onde permanecem vivas e livres do sistema imunológico¹⁰.

A cinética da produção de anticorpos IgM e IgG já é bem conhecida, sendo que ao final da primeira semana após a infecção, podem ser detectadas concentrações de antígeno superiores a 25ng/ml nos soros de camundongos infectados⁶. Estudos mostraram que os níveis máximos de IgM e IgG ocorreram entre 42 e 70 e entre 70 e 90 dias pós-infecção, respectivamente, ambos permanecendo altos até os 180 dias pós-infecção; não sendo possível discriminar a fase da infecção através dos níveis relativos destas imunoglobulinas^{25 6}.

TABELA 1 - Número de larvas presentes no encéfalo de camundongos e absorbâncias pela técnica de ELISA Indireto frente ao TES, 105 dias após a infecção

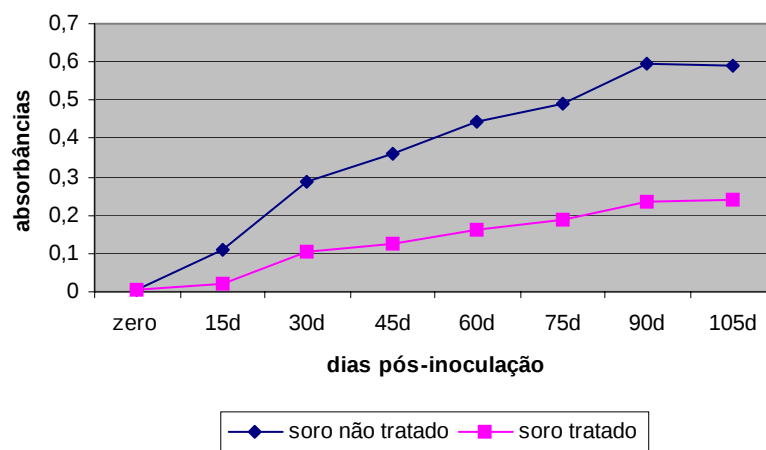
Identificação dos camundongos	Nº de larvas no encéfalo	Absorbâncias (IgG)
1C	20	1,101
1L	84	0,619
1MD	41	0,43
1ME	22	0,427
1PD	44	0,705
1PE	34	1,15
2L	10	0,294
2MD	6	0,275
2ME	30	1,001
2PD	27	0,475
2PE	38	1,051
4L	8	0,489
4MD	40	0,474
4PD	14	0,425
4SI	12	0,5
5L	21	0,445
5PE	17	0,836
6L	33	0,327
6MD	46	0,451
6ME	52	0,36
6PD	45	0,501
7L	4	0,741
7MD	17	0,608
7ME	20	0,503
7PD	10	0,568

Regressão linear ($P>0,05$); I.C. 95%.

Para avaliar a avidéz da IgG ao TES, primeiramente foi padronizado o teste de ELISA com diferentes concentrações de uréia, obtendo-se o melhor resultado quando foi utilizada a uréia na concentração de 6M e uma lavagem da placa durante dois minutos. Na **Figura 1**, estão representadas as médias de absorbâncias de 25 camundongos BALB/c nos diferentes dias após a infecção com larvas de *T. canis*. De acordo com a análise de variância com medidas repetidas, ocorreu uma diferença significativa ($P<0,01$) entre os níveis de IgG após o tratamento com uréia 6M em todos os períodos analisados. O experimento foi conduzido até os 105 dias após a infecção dos animais, quando a infecção crônica já deveria estar instalada.

Na toxoplasmose, assim como ocorre na LMV, a IgM pode persistir por meses ou anos após a infecção. Por isso, autores discutem a importância do teste de avidéz de IgG quando o soro é positivo para anticorpos IgG e IgM, pois

a presença de anticorpos anti-IgM pode ser erroneamente interpretada como indicativo de uma infecção aguda³.



Soros tratados e não tratados, no gráfico, diferem significativamente ($P < 0,01$) em todos dias pós-inoculação

FIGURA 1 – Absorbâncias médias da IgG do soro de camundongos experimentalmente infectados com *T. canis*, tratado e não tratado com uréia 6M, através do ELISA Indireto.

Analisando as percentagens de avides da IgG de cada um dos 25 camundongos BALB/c, obtidas nos diferentes dias pós-inoculação foi observado um baixo percentual de avides aos 15 dias pós-infecção (entre 7,25 e 27,5%), sugerindo que neste período está instalada a infecção aguda (**Figura 2**). Uma avides intermediária da IgG foi constatada até os 45 dias pós-inoculação (entre 27,5 e 31,4%) e após 60 dias de infecção todos os animais apresentaram avides acima de 31,4% o que caracterizou a infecção a fase crônica da LMV (**Figura 2**). Estudos que determinam o percentual de avides da IgG para antígenos de *Toxoplasma gondii*, também demonstraram níveis de avides classificados como intermediários, entre a baixa e a alta avides^{3 24}. Esta faixa provavelmente indica o limite entre a infecção recente e tardia, sendo que índices de avides acima deste percentual levam-nos a sugerir que a infecção crônica já se estabeleceu.

O índice de avides da IgG humana pelo TES, característico da fase crônica da infecção e determinado a partir de uma população de 1376 indivíduos da República Tcheca, foi acima de 40%¹³. O percentual de avides da

IgG estabelecido por estes autores como determinante da infecção aguda e crônica, difere do estabelecido neste trabalho. No entanto, no presente estudo foram utilizados camundongos comprovadamente infectados por *T. canis* para padronizar o teste de avidéz, animais que embora sejam modelos experimentais adequados para estudos da LMV, possuem um comportamento que difere daquele apresentado pelo homem, quando a avidéz da IgG pelos antígenos de *T. canis* foi avaliada.

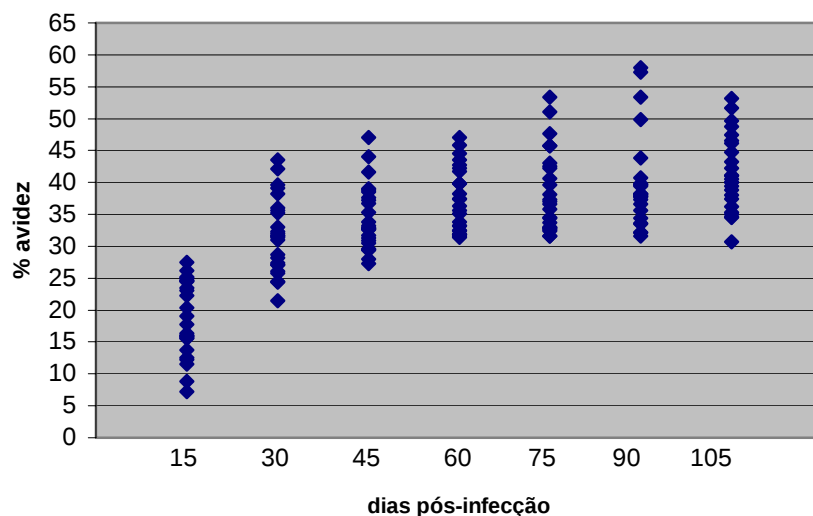


FIGURA 2 – Percentual de avidéz da IgG anti-TES através de ELISA Indireto em 25 camundongos experimentalmente infectados com ovos de *T. canis*, nos diferentes dias pós-inoculação.

Esta diferença também foi constatada em estudos de infecções por *Toxoplasma gondii* em humanos e em ovelhas, onde a infecção crônica no homem foi estabelecida quando o percentual de avidéz da IgG foi maior que 40%⁵, e em ovinos quando foi maior que 35%²⁴.

Assim, para cada doença analisada é importante avaliar as peculiaridades imunológicas de cada hospedeiro estudado. De acordo com as pesquisas de avidéz da IgG humana para toxoplasmose, a fase aguda da doença parece durar até pelo menos cinco meses após o aparecimento dos sintomas⁵, enquanto que em ovinos a toxoplasmose aguda manifesta-se até a quarta semana após a infecção²⁴. O mesmo poderá acontecer com o estudo da fase aguda e crônica da LMV, pois no homem o período necessário para que se

estabeleça a fase crônica deve diferir dos camundongos, por tratar-se de um hospedeiro diferente e com características imunológicas próprias.

Até o momento, poucos estudos utilizaram uréia como determinante da avidéz da IgG através de ELISA para a LMV^{13 11}. Entretanto, em várias doenças infecciosas como a toxoplasmose^{24 16 14}, a rubéola²³, a varicela²¹ e o cytomegalovírus humano²⁶, a avaliação da avidéz vem sendo utilizada no diagnóstico. Segundo estes autores, o estudo da avidéz da IgG é potencialmente útil para o imunodiagnóstico das doenças e pode ser incluído no diagnóstico complementar e diferencial entre a infecção primária assintomática e infecção secundária, quando os níveis de IgM permanecem altos ao longo da infecção.

Este estudo mostrou que o teste imunoenzimático de ELISA utilizando tratamento com uréia é uma alternativa para discriminar as fases de infecção da LMV em camundongos BALB/c. A determinação da fase de infecção da doença em humanos é uma etapa que deverá ainda ser estudada, pois o tratamento da LMV é dependente da fase em que a doença se encontra e da severidade dos sinais clínicos¹⁹ e geralmente é bem sucedido quando o diagnóstico é precoce¹⁸.

REFERÊNCIAS

1. Ajayí OO, Duhlińska SM, Agwale SM, Njoku M. Frequency of human Toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95: 147-149, 2000.
2. Alderete JMS, Jacob CMA, Pstorino AC, Elefant GR, Castro APM, Fomin ABF, Chieffi PP. Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butantã region, São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98: 593-597, 2003.
3. Alvaro-Esquivel C, Sethi S, Janitschke K, Hahn H, Liesenfels O. Comparison of two commercially available avidity tests for toxoplasma-specific IgG antibodies. Archives of Medical Research 33: 520-523, 2002.
4. Beaver PC, Snyder H, Carrera G, Dent JH, Lafferty J W Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: report of three cases. Pediatrics 9: 7-19, 1952.
5. Bertozzi LC, Suzuki LA, Rossi CL. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection response to avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. Revista do Instituto de Medicina Tropical da São Paulo 41: 175-177, 1999.
6. Bowman DD, Mika-Grieve M, Grieve RB. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 36: 75-82, 1987.
7. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254, 1976.
8. De Savigny DH. *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. Journal of Parasitology 61: 781-782, 1975.
9. Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. Clinical Microbiology Reviews 16: 265-272, 2003.
10. Dunsmore JD, Thompson RCA, Bates IA. The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. International Journal for Parasitology 13: 517-521, 1983.
11. Förstl M, Buchta V, Psohlavec J, Cermák P, Cermáková Z, Uuban J, Chrzová M. Diagnostika larvální toxokarózy. Klinika Mikrobiologie Infekce Lekarske 10: 181-185, 2004.
12. Havasiová-Reiterová K, Tomasovicová O, Dubinský P. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral

response and distribution of larvae in mice. *Parasitology Research* 81: 13-17, 1995.

13. Hubner J, Uhlikova M, Leissova M. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. *Epidemiologie Mikrobiologie Immunologie* 50: 67-70, 2001.

14. Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1972-1977, 1997.

15. Kayes SG, Oaks JA. Effect of inoculum size and length of infection on the distribution of *Toxocara canis* larvae in the mouse. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 25: 573-580, 1976.

16. Kneitz RH, Shubert J, Tollmann F, Zens W, Hedman K, Weissbrich B. A new method for determination of varicella-zoster virus immunoglobulin G avidity in serum and cerebrospinal fluid. *BMC Infectious Diseases* 4: 33, 2004.

17. Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Annali de Istituto Superiore di Sanità* 40: 81-88, 2004.

18. Machado AB, EL Achkar ME Larva migrans visceral: relato de caso. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 78: 215-219, 2003.

19. Magnaval JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *The Korean Journal of Parasitology* 39: 1-11, 2001.

20. Maizels RM, Blaxter ML, Robertson BD, Selkirk ME. Parasite antigens, parasite genes. A laboratory manual for molecular parasitology. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 224 p.

21. Onno, E, Laffer MM, Weckx LY, Granato C, Moraes-Pintos MI. A simple and cheaper in house varicella zoster virus antibody indirect elisa. *Revista do Instituto de Medicina Tropical da São Paulo* 46: 165-168, 2004.

22. Page AP, Richards DT, Lewis JW Omar HM, Maizels RM. Comparison of isolates and species of *Toxocara canis* by biosynthetic labeling of somatic and ES proteins from infective larvae. *Parasitology* 103: 451-464, 1991.

23. Reis MM, Tessaro MM, Cruz e Silva J, Giordano SA, Azevedo PA. Avidity of IgG for rubella: an evaluation of the need for implementation at the materno-infantil Presidente Vargas Hospital in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 8: 249-254, 2004.

24. Sager H, Gloor M, Tenter A, Maley S, Hässig M, Gottstein B. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA *Parasitology Research* 91: 171-174, 2003.

25. Scaini CJ. Produção de anticorpos monoclonais anti-antígeno de excreção e secreção de larvas de *Toxocara canis* e cinética da produção de anticorpos anti- *T. canis* em camundongos BALB/c infectados experimentalmente. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2001.
26. Souza S, Bonon SHA, Costa SCB, Rossi CL. Evaluation of an in-house specific immunoglobulin g (IGG) avidity ELISA for distinguishing recent primary from long-term human citomegalovirus (HCMV) infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 45: 323-326, 2003.
27. Statistix 8. Statistix user's manual. Analytical software. Tallahassee, FL. 2003.
28. Wade SE & Geogi JR. Radiolabeling and autoradiographic tracing of *Toxocara canis* larvae in male mice. *Journal of Parasitology* 73: 116-120, 1987.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- A soroprevalência da LMV em crianças de 1 a 12 anos na região de Pelotas é alta (50,6%), sugerindo contaminação ambiental com ovos de *T. canis*;
- O contato com cães e gatos é um importante fator de risco na aquisição da infecção por *T. canis*;
- Uma fração de 30 kDa do antígeno TES é uma proteína importante para estudos de diagnóstico específico da LMV;
- Os níveis de anticorpos IgG anti-TES não estão relacionados ao número de larvas de *T. canis* presentes no encéfalo de camundongos infectados experimentalmente;
- Utilizando o ELISA Indireto com uréia 6M é possível discriminar as fases de infecção da LMV em camundongos experimentalmente infectados com *T. canis*.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

ABE JACOB, C.M.A.; PASTORINO, A C.; PERES, B.A ; MELLO, E. O ; OKAY, Y. ; OSEKA, G.W. Clinical and laboratorial features of visceral toxocariases in infancy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n.11, p.19-26, 1994.

ABE JACOB, C. M.; PERES, B. A.; CHIEFFI, P.P.; OSELKA, G. W.; PASTORINO, A. C.; ROIZENBLATT, J. Visceral Larva Migrans Syndrome Due to *Toxocara canis*. **Pediatrics**, v. 9, p.19-26, 1987.

AGUIAR-SANTOS, A.M., ANDRADE, L., MEDEIROS, Z., CHIEFFI, P. P. LESCANO, S., PEREZI, E. Human toxocariasis: frequency of anti-*Toxocara* antibodies in children and adolescents from an outpatient clinic for lymphatic filariasis in Recife, Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 2, p.81-85, 2004.

AJAYÍ, O.O.; DUHLINSKA, S.M.; AGWALE, S.M.; NJOKU, M. Frequency of human Toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 147-149, 2000.

ALCÂNTARA, N.; BAVIA, E.; SILVÃO, R.M.; CARVALHO, E. Environmental contamination by *Toxocara* sp eggs in public areas of Salvador, Bahia, State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, n. 4, p. 187-190, 1989.

ALDERETE, J.M.S.; JACOB, C.M.A.; PASTORINO, A.C.; ELEFANT, G.R.; CASTRO, A.P.M.; FOMIN, A.B.F.; CHIEFFI, P.P. Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butantã region, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 593-597, 2003.

ALONSO, J.M.; BOJANICH, M.V.I.; CHAMORRO, M.; GORODNER, J.O. *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 4, p. 235-237, 2000.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; SETHI, S.; JANITSCHKE, K.; HAHN, H., LIESENFELD, O. Comparison of two commercially available avidity tests for toxoplasma-specific IgG antibodies. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 520-523, 2002.

ANTOLOVÁ, D.; REITEROVÁ, K.; MITERPA'KOVA, M.; STANKO, M.; DUNINSKY, P. Circulation of *Toxocara* spp. in suburban and rural ecosystems in the Slovak Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 317-324.

AUER, H., ASPOCK, H. *Toxocara* infestations na toxocarosis in Austria: results of immunodiagnostic and seroepidemiological studies. In: VII EUROPE MULTICOLLOQUIUM OF PARASITOLOGY, 7, 1996, Parma. **Abstrats...** Parma, Itália, Parasitologi-Roma, 1996. p. 217.

BACHMEYER, C.; LAMARQUE, G.; MORARIU, R.; MOLINA, T.; BOURÉE, P.; DELMER, A. Visceral larva migrans mimicking lymphoma. **CHEST**, v. 123, p. 1296-1297, 2003.

BEAVER, P. C. The nature of visceral larva migrans. **Journal of Parasitology**, v. 55, n.1, p. 3-12, 1969.

BEAVER, P. C.; SNYDER, H.; CARRERA, G.; DENT, J. H.; LAFFERTY, J. W. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: report of three cases. **Pediatrics**, v. 9, p. 7-19, 1952.

BERNE, M.E.A **Identificação e purificação de antígenos somáticos de formas adultas de *Fasciola hepática* através de anticorpos monoclonais: ensaios de imunoproteção e imunodiagnóstico**. Belo Horizonte, 1994. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.

BERTOZZI, L.C.; SUZUKI, L. A.; ROSSI, C. L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection response to avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 3, p. 175-177, 1999.

BOYCE, W. M.; BRANSTETTER, B. A.; KAZACOS, K. R. Comparative analysis of larval excretory-secretory antigens of *Baylisascaris procyonis*, *Toxocara canis* and *Ascaris suum* by western blotting and enzyme immunoassay. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 109-113, 1988.

BOWMAN, D.D.; MIKA-GRIEVE, M.; GRIEVE, R.B. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 1, p. 75-82, 1987.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMARGO, E.D.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J.; SILVA, M.V.; CHIEFFI, P.P.; MELO, E.O. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 1, p. 55-60, 1992.

CAMPOS JÚNIOR, D.; ELEFANT, G.R.; SILVA, E.O.M.; GANDOLFI, L.; ABE JACOB, C.M.; TOFETI, A.; PRATESI, R. Frequência de soropositividade para antígenos de *Toxocara canis* em crianças de classes sociais diferentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 4, p. 509-513, 2003.

CHIEFFI, P. P. **Contribuição ao estudo da síndrome da "larva migrans" visceral, causada por larvas de *Toxocara* (Stiles & Hassal, 1905), em cinco municípios do Estado de São Paulo, Brasil: inquérito soroepidemiológico.** São Paulo, 1984. 122 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1984.

DE SAVIGNY, D. H. *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. **Journal of Parasitology**, v. 61, p. 781-782, 1975.

DEAM, A.G.; DEAM, J.A.; COULMOLIN, D.; BRENDEN, K.A., SMITER, D. C.; BURTON, A.H.; DICKER, R.C.; SULLIVAN, K.; FAGAN, R.F.; ARNOR, T.J. 1994. Epi Info Version 6.0. A word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. **Center for disease control and Prevention Atlanta, G.A.**

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, vl. 16, n. 2, p. 265-272, 2003.

DUNSMORE, J.D.; THOMPSON, R.C.A.; BATES, I.A. The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. **International Journal for Parasitology**, v. 13, n. 5, p. 517-521, 1983.

FAN, C.K.; HUNG, C.C.; DU, W.Y.; LIAO, C.W.; SU, K.E. Seroepidemiology of Toxocaracanis infection among mountain aboriginal schoolchildren living in contaminated districts in eastern Taiwan. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, p. 1312-1318, 2004.

FERRAZ, M.L. **Contaminação da areia por ovos e larvas de helmintos e oocistos de protozoários na praia do laranjal.** Pelotas, 2002. 45f. Monografia – Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, 2002.

FERRAZ, C.N.; KENBAUY, J.; FARHAT, C.K.; CLARO, J.T.; SILVA, M.P. Eosinofilia realcionada à larva migrans visceral. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 26, p. 253-254, 1980.

FÖRSTL, M.; BUCHTA, V.; PSOHLAVEC, J.; CERMÁK, P.; CERMÁKOVÁ, Z.; URBAN, J.; CHRZOVÁ, M. Diagnostika larvální toxokarózy. **Klinika Mikrobiologie Infekc Lekarske**, v. 10, n. 4, p. 181-185, 2004.

GARCÍA, M.E.; DÍAZ-SÚARES; ARAUJO-FERNÁNDEZ, M.; CHENG-NG,R.; ARAUJO, J.; ANDRADE,D; CASTELIANO, J.;ESTÉVEZ, J.L.; CABRERA,L. Prevalencia de anticuerpos anti- *Toxocara canis* en una población infantil de la parroquia de San Rafael del Moján Estado Zulia, Venezuuela. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGIA, 15, 2001, São Paulo. **Resumos...** São Paulo, SP:Jornal Brasileiro de Patologia. v. 37 n. 4, 2001. p.125.

GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; FORTUNA, M.; OSIMANI, P.; ANTONICELLI, L.; DEL PRETE, M.S.; RIVA, A.; D'ERRICO, M.M.; PETRELLI, E.; SCALISE, G. Environmental and sorological evidence for the presense of toxocariasis in the urban area of Ancona, Italy. **European Journal of Epidemiology**, v. 16, n. 11, p. 1023-1026, 2000.

GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ P.M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiology Reviews**, v. 3, p. 230-250 1981.

GUILHERME, A. C. F.; ARAÚJO, S. M.; FALAVIGNA, D. L. M.; PUPULIN, A. R. T.; DIAS, M. L. G. G.; OLIVEIRA, H. S.; MAROCO, E.; FUKUSHIGUE, Y. Prevalência de enteroparasitos em horticultores e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá Paraná. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 4, p. 405-411, 1999.

HABLUETZEL, A.; TRALDI, G.; RUGGIERI, S.; ATTILI, A.R.; SCUPPA, P.; MARCHETTI, R.; MENGhini, G.; ESPOSITO, F. Na estimation of *Toxocara canis* prevalence in dog, environmental eggs contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 243-252, 2003.

HAVASIOVÁ-REITEROVÁ, K.; TOMASOVICOVÁ, O.; DUBINSKÝ, P. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. **Parasitology Research**, v. 81, p. 13-17, 1995.

HUBNER, J.; UHLIKOVA, M.; LEISSOVA, M. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. **Epidemiologie Mikrobiologie Immunologie**, v. 50, n. 2, p. 67-70, 2001.

JENUM, P.A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A.G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n. 8, p. 1972-1977, 1997.

KAPLAN, M.; KALKAN, A.; HOSOGLU, S.; KUK, S.; OZDEN, M.; DEMIRDAG, K.; OZDARENDELI The frequency of *Toxocara* infection in mental retarded children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, 121-125, 2004.

KAYES, S.G.; OAKS, J.A. Effect of inoculum size and length of infection on the distribution of *Toxocara canis* larvae in the mouse. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 25, n. 4, p. 573-580, 1976.

KENNEDY, M.W.; QURESHI, F.; HASWAELL-ELKINS, M. & ELKINS, D.B. Homology and heterology between secreted antigens of the parasitic larval stages of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. **Clinical experimental Immunology**, v. 67, p. 20-30, 1987.

KNEITZ, R.H.; SCHUBERT, J.; TOLLMANN, F.; ZENS, W.; HEDMAN, K.; WEISSBRICH, B. A new method for determination of varicella-zoster virus immunoglobulin G avidity in serum and cerebrospinal fluid. **BMC Infectious Diseases**, 4: 30, 2004.

LAPPALAINEN, M.; HEDMAN, K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. **Annali de Instituto Superiore di Sanità**, v. 40, n. 1, p. 81-88, 2004.

LESCANO, S.A.; CHIEFFI P.P.; PERES B.A.; de MELLO, E.O.; VELARDE, C.N.; SALINAS, A.A.; ROJAS, C.E. Soil contamination and human infection by *Toxocara* sp. in the urban area of Lima, Peru. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 6:733-734, 1998.

LYNCH, N.R.; WILKES, L.K.; HODGEN, A.N.; TURNER, K.J. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. **Parasite Immunology**, v. 10, p. 323-337, 1988.

MACHADO, A.B.; EL ACHKAR, M.E. Larva migrans visceral: relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 2, p. 215-219, 2003.

MAGNAVAL, J.F.; GLICKMAN, L.T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 1-11, 2001.

MAGNAVAL, J.F.; FABRE, R.; MAURIERES, P.; CHARLET, J.P.; de LARRARD, B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitology Research**, v. 77, 697-702, 1991.

MAIZELS, R.M.; BLATEX, M.L.; ROBERTSON, B.D.; SELKIRK, M.E. **Parasite antigens, parasite genes. A laboratory manual for molecular parasitology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 224 p.

MARMOR, M.L.; GLICKMAN, L.; SHOFR, F. *Toxocara canis* infection of children: epidemiologic and neuropsychologic findings. **American Journal of Public Health**, v. 77, p.554-559, 1987.

MEIGHJI, M.; MAIZELS, R.M. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 18, p.155-170, 1986.

MILANO, A. M. F.; OSCHEROV, E. B.; Contaminación por parasitos caninos de importância zoonótica em playas de la ciudad de Corrientes, Argentina. **Parasitologia latinoamericana**, v. 57, p. 119-123, 2001.

MORALES, O.L.; LOPEZ, M.C.; NICBOLLS, R.S.; AGUDELO, C. Identification of *Toxocara canis* antigens by western blot in experimentally infected rabbits. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 44, p. 213-216, 2002.

MOREIRA-SILVA, S.F; LEÃO, M.E.; MENDONÇA, H.F.S.; PEREIRA, F.E.L. Toxocaríose do SNC: com descrição de dois casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 2, p. 169-174, 2004.

MOREIRA-SILVA, S.F; LEÃO, M.E.; MENDONÇA, H.F.S.; PEREIRA, F.E.L. Prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in a random sample of in patients at a children's hospital in Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 4, p. 259-261, 1998.

NUNES, C.M.; TUNDISI, R.N.; HEINEMANN, M.B.; OGASSAWARA, S.; RICHTZENHAIN, L.J. Toxocaríasis: sorological diagnosis by indirect antibody competition ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 2, p. 95-100, 1999.

NUNES, C.M.; TUNDISI, R.N.; GARCIA, J.F.; HEINEMANN, M.B.; OGASSAWARA, S.; RICHTZENHAIN, L.J. Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by Western blotting technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 5, p. 253-256, 1997.

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

ONNO, E.; LAFFER, M.M; WECKX, L.Y; GRANATO, C.; MORAES-PINTO, M.I. A simple and cheaper in house varicella zoster virus antibody indirect elisa. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 3, p. 165-168, 2004.

OVERGAAUW, P.A. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocarosis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 215-231, 1997.

PAGE, A.P.; RICHARDS, D.T.; LEWIS, J.W.; OMAR, H.M.; MAILZELS, R.M. Comparison of isolates and species of *Toxocara canis* by biosynthetic labeling of somatic and ES proteins from infective larvae. **Parasitology**, v. 103, p. 451-464, 1991.

PARK, H.Y.; LEE, S.U.; HUH, S.; KONG, Y.; MAGNAVAL, J.F. A seroepidemiological survey for toxocaríasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 40, n. 3, p. 113-117, 2002.

PRUNIER, F.; DELPINE, S.; VICTOR, J. Löffler's fibroblastic endocarditis. A report of a case complicating toxocariasis. **Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux**, v. 94, p. 226-230, 2001.

RADMAN, N.E.; ARCHELLI, S.M.; FONROUGE, R.D.; del V GUARDIS, M.; LINZITTO, O.R. Human Toxocariosis. Its soroprevalence in the city of La Plata. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 201-205, 2000.

RAYES, A.A.; TEIXEIRA, D.; SERUFO, J.C.; NOBRE, V.; ANTUNES, C.M.; LAMBERTUCCI, J.R. Human toxocariasis and pyogenic liver abscess: A possible association. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 2, p. 563-566, 2001.

REIS, M.M.; TESSARO, M.M.; CRUZ E SILVA, J.; GIORDANO, S.A.; AZEVEDO, P.A. Avidity of IgG for rubella: an avaluation of the need for implementation at the materno-infantil Presidente Vargas Hospital in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 249-254, 2004.

SAGER, H.; GLOOR, M.; TENTER, A.; MALEY, S.; HÄSSIG, M.; GOTTSTEIN, B. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. **Parasitology Research**, v. 91, p. 171-174, 2003.

SALINAS, P.; MATAMALA, M.; SCHENONE, H. Prevalência de hallazgo de huevos de *Toxocara canis* em Plaza de la Región Metropolitana de la ciudad de Santiago, Chile. **Boletín chileno de parasitologia**, v. 57, n.3-4, 2001.

SANTARÉM, V. A.; SARTOR, I. F.; BERGAMO, F. M. M. Contaminação, por ovos de *Toxocara* spp, de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 6, p. 529-532, 1998.

SANTOS, G.K.P.; CHIOCHETTA, D.; ABDALL, N.M.; MARQUES, S.B.; FERNANDES, C.; MÜLLER, G. Ovos e oocistos de parasitos em verduras consumidas cruas. In: III SEMINÁRIO NACIONAL DE ZOONOSES E ANIMAIS PEÇONHENTOS GUARAPARI, 1998, Guarapari. **Anais...** Guarapari, ES – SESC, 1998, n. 15.

SCAINI, C.J. **Produção de anticorpos monoclonais anti-antígeno de excreção e secreção de larvas de *Toxocara canis* e cinetica da produção de anticorpos anti- *T. canis* em camundongos BALB/c infectados experimentalmente.** Pelotas, 2001. 72f. Tese (Doutorado) Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, 2001.

SCHANTZ, P. M. Parasitic zoonosis in perspective. **International Journal for Parasitology**, v. 21, p.161-170, 1991.

SCHANTZ, P.M.; GLICKMAN, L.T. Ascarídeos de perros y gatos: un probelma da salud publica y de medicina veterinaria. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 94, n. 6, p. 571-586, 1983.

SHETTY, A.K. & AVILES, D.H. Nephrotic syndrome associated with *Toxocara canis* infection. **Annls of Tropical Paediatrics: International Child Health**, v. 19, p. 297-300, 1999.

SOULSBY, L. Parasitic zoonoses: New perspectives and emerging problems **Health and Hygiene**, v. 12, p. 66-77, 1991.

SOUZA, S.; BONON, S.H.A; COSTA, S.C.B.; ROSSI, C.L. Evaluation of an in-house specific immunoglobulin g (IGG) avidity ELISA for distinguishing recent primary from long-term human cytomegalovirus (HCMV) infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, 323-326, 2003.

SPEISER, F.; GOTTSTEIN, B. A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. **Acta Tropica**, v. 41, p. 361-372, 1984.

STATISTIX 8. Statistix user's manual. **Analytical software**. Tallahassee, FL. 2003.

TAVARES, A L.C. **Contaminação do solo por ovos de helmintos e oocistos de protozoários nas praças de conjuntos habitacionais verticais de Pelotas, RS, Brasil**. Pelotas, 1999. 62 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 1999.

TSUJI, O.V.; BARBABOSA, I.M.; ZAVALA, J.T.; HERNÁNDEZ, A.R.; TORRES, A.P. Verduras de consumo humano como probable fuente de infección de *Toxocara* sp. para el hombre. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 52, p. 47-50, 1997.

TSUJI, O.V.; HERNÁNDEZ, A.R.; BARBOSA, I.M.; MARÍN, P.N.M.; ZAVALA, J.T.; TORRES, A.P. Contaminación de suelos por huevos de *Toxocara* sp. En parques públicos y jardines de casas-habitación de la ciudad de México. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 51, p. 54-58, 1996.

TOMPSON, D. E., BUNDY, D.A COOPER, E.S. Epidemiological characteristics of *Toxocara canis* zoonotic infection of children in a Caribbean community. **Bulletin of World Health Organisation**, v. 64, p. 283-290, 1986.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, G. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TUNDISI, R.N.; CAMARGO, E.D.; NUNES, C.M.; KANAMUR, H.Y. Teste imunoenzimático (ELISA-IgG) na elucidação diagnóstica de casos com suspeita clínica de larva migrans visceral (LMV). In CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 31, 1995, Rebouças. **Resumos...** Rebouças, SP: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1995. p. 115.

VILLELA, M.M.; MOURA, N.O.; HOMSY, S.R.; FERREIRA, R.C.; MOURA, A.; VARGAS, E.J.; BERNE, MEA 2003. Prevalência de parasitos intestinais diagnosticados no UFPel – Lab (Pelotas, RS, Brasil), referentes a um ano de análises. **Laes & Haes**, 141: 120-128.

WADE, S.E. & GEOGI, J.R. Radiolabeling and autoradiographic tracing of *Toxocara canis* larvae in male mice. **Journal of Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 116-120, 1987.

WERBLIN, T.P. & SISKIND, G.W. Distribution of antibody affinities: technique of measurement. **Immunochemistry**, v. 9, p. 987-1011, 1972.

WOLFE, A. & WRIGHT, I.P. Human toxocariasis and direct contact with dogs. **Veterinary Record**, v.152, p. 419-422, 2003.

APÊNDICE A

TABELA 1A - Cinética da produção de anticorpos IgG anti-TES de 25 camundongos infectados oralmente com ovos de *T. canis*, através de ELISA Indireto não tratado com uréia 6M

	15d	30d	45d	60d	75d	90d	105d
1C	0,143	0,727	0,728	0,933	0,999	1,182	1,101
1L	0,138	0,143	0,393	0,493	0,615	0,538	0,619
1MD	0,057	0,143	0,345	0,455	0,377	0,57	0,43
1ME	0,081	0,347	0,338	0,357	0,388	0,487	0,427
1PD	0,214	0,395	0,465	0,471	0,542	0,583	0,705
1PE	0,192	0,247	0,454	0,726	0,779	1,081	1,15
2L	0,025	0,326	0,221	0,209	0,213	0,277	0,294
2MD	0,142	0,2	0,199	0,194	0,253	0,245	0,275
2ME	0,135	0,255	0,527	0,687	0,756	0,97	1,001
2PD	0,045	0,184	0,247	0,367	0,404	0,587	0,475
2PE	0,272	0,504	0,63	0,773	0,732	1,004	1,051
4L	0,051	0,095	0,24	0,257	0,356	0,436	0,489
4MD	0,119	0,214	0,267	0,417	0,377	0,473	0,474
4PD	0,103	0,274	0,346	0,549	0,395	0,456	0,425
4SI	0,063	0,175	0,177	0,29	0,442	0,709	0,5
5L	0,039	0,17	0,164	0,182	0,249	0,312	0,445
5PE	0,251	0,5	0,479	0,658	0,728	0,874	0,836
6L	0,082	0,326	0,503	0,542	0,615	0,628	0,327
6MD	0,084	0,303	0,333	0,403	0,433	0,464	0,451
6ME	0,04	0,203	0,213	0,273	0,285	0,335	0,36
6PD	0,049	0,266	0,252	0,238	0,326	0,449	0,501
7L	0,126	0,439	0,398	0,497	0,536	0,82	0,741
7MD	0,052	0,192	0,304	0,338	0,491	0,489	0,608
7ME	0,182	0,283	0,382	0,406	0,511	0,523	0,503
7PD	0,056	0,304	0,396	0,421	0,434	0,419	0,568
média	0,110	0,289	0,360	0,445	0,489	0,596	0,590

TABELA 2A - Cinética da produção de anticorpos IgG anti-TES de 25 camundongos infectados oralmente com ovos de *T. canis*, através de ELISA Indireto tratado com uréia 6M

	15d t	30d	45d t	60d t	75d t	90d t	105d t
1C	0,036	0,235	0,239	0,297	0,316	0,441	0,452
1L	0,01	0,41	0,185	0,232	0,293	0,308	0,32
1MD	0,014	0,056	0,113	0,151	0,135	0,203	0,172
1ME	0,019	0,151	0,103	0,116	0,134	0,163	0,131
1PD	0,056	0,102	0,13	0,216	0,248	0,22	0,29
1PE	0,03	0,087	0,151	0,272	0,309	0,372	0,403
2L	0,004	0,116	0,065	0,076	0,09	0,106	0,127
2MD	0,035	0,072	0,073	0,083	0,087	0,093	0,11
2ME	0,024	0,08	0,186	0,228	0,307	0,425	0,395
2PD	0,011	0,057	0,073	0,146	0,185	0,239	0,236
2PE	0,043	0,16	0,237	0,289	0,268	0,383	0,4
4L	0,007	0,04	0,100	0,112	0,116	0,173	0,232
4MD	0,019	0,046	0,087	0,133	0,124	0,152	0,184
4PD	0,021	0,075	0,102	0,193	0,133	0,147	0,159
4SI	0,012	0,056	0,078	0,091	0,145	0,238	0,181
5L	0,009	0,046	0,051	0,081	0,095	0,121	0,157
5PE	0,039	0,191	0,186	0,262	0,313	0,334	0,289
6L	0,01	0,092	0,159	0,183	0,199	0,249	0,174
6MD	0,021	0,12	0,13	0,17	0,184	0,248	0,21
6ME	0,011	0,053	0,07	0,087	0,094	0,106	0,146
6PD	0,008	0,065	0,079	0,077	0,174	0,177	0,173
7L	0,028	0,145	0,148	0,177	0,2	0,3	0,342
7MD	0,006	0,052	0,117	0,141	0,182	0,185	0,257
7ME	0,016	0,069	0,129	0,155	0,261	0,261	0,225
7PD	0,007	0,096	0,108	0,133	0,137	0,243	0,277
média	0,020	0,107	0,124	0,164	0,189	0,235	0,242