



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE ELISA INDIRETO PARA
DETECÇÃO ESPECIFICA DE IgG ANTI-TOXOCARA EM CÃES**

CARLOS JOSÉ SANTOS VIRGENS

**SALVADOR - BAHIA
MARÇO/2015**

CARLOS JOSÉ SANTOS VIRGENS

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE ELISA INDIRETO PARA
DETECÇÃO ESPECÍFICA DE IgG ANTI-TOXOCARA EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Stella Maria Barrouin Melo

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Neuza Maria Alcântara Neves

SALVADOR – BAHIA
MARÇO/2015

AGRADECIMENTOS

Sinto-me feliz por chegar até aqui, e saber que esta conquista só foi possível devido à presença marcante de pessoas tão importantes e maravilhosas, ao qual posso arriscar a dizer, que sem elas hoje eu não seria metade do que sou como filho, amigo e Veterinário. Agradeço a todos que me apoiaram ao longo desta jornada, pois é preciso mais que vontade e sonho para alcançar um ideal, por isso menciono aqui aqueles que durante toda minha vida não acrescentaram apenas anos, mas contribuíram para minha formação de um modo geral.

A DEUS, esta luz que ilumina minha vida, sem o qual não teria forças, para vencer e acreditar em minha capacidade de superação das dificuldades e pedras ao longo de minha caminhada fazendo – me acreditar que TUDO POSSO NAQUELE ME FORTALECE e que nada nem ninguém neste mundo iria me fazer desistir dos meus objetivos.

Aos meus pais, Maria Helena dos Santos e Luiz Carlos Ramos Virgens, exemplos de superação, amor e dedicação que souberam me educar e formaram quem hoje eu sou. A eles minha eterna gratidão, por tudo que fizeram e tem feito incondicionalmente.

À minha orientadora Prof.^a Stella Maria Barrouin Melo, pela dedicação, confiança, ensinamentos, paciência, incentivos e pela extensa ajuda do primeiro ao último momento, desde a elaboração a conclusão deste trabalho sempre com a contribuição dos seus imensos conhecimentos.

À minha Co-orientadora Prof.^a Neuza Maria Alcântara Neves, primeiramente pelo acolhimento e recepção no Laboratório de Alergia e Acarologia e principalmente por toda orientação e ajuda na condução deste trabalho. Excelente pessoa e profissional ao qual pude conviver e admirar pela conduta como líder a frente do laboratório e do Grupo Pesquisa em *Toxocara canis*.

À Prof^a Daniela Farias Laranjeiras, pessoa excepcional na profissão que contribuiu diretamente ao trabalho com seus vastos conhecimentos, além de ter mostrado que é possível sim fazer ciência visando o bem estar animal. Pois todos os animais resgatados, foram adotados por pessoas responsáveis.

Ào Médico Veterinário técnico do Laboratório de Diagnóstico das parasitoses dos Animais, Sr^o Ademilton, por ter disponibilizado seu tempo e conhecimento para ensinar-me a realização do diagnóstico parasitológico em cães.

À todos de minha família e em especial meus avós maternos Anfilófilo e Florentina (*In memoriam*), paterno Ademar e Ruth), minhas tias (Anatália, Elzelita e Hilda) minhas irmãs (Flora, Adriana e Deise) minhas primas (Aline, Arilma e Aislene Gabriel), pela união, amor, respeito, carinho, amizade, pelas alegrias compartilhadas em todos os momentos e pelo apoio que me deram ao longo de todo o meu trajeto, que veio a tornar este meu sonho possível.

À diretoria e funcionários do Abrigo São Francisco (ABPA) em especial a Médica Veterinária e amiga Margarete Neves. Que se mostraram sempre dispostos a contribuir para pesquisa, colaborando sempre nas atividades do grupo.

A Fernanda de Santana Barros, namorada e principalmente amiga, companheira e confidente, por estar sempre ao meu lado, pela paciência e compreensão de todos os momentos em que me fiz ausente para o desenvolvimento do projeto.

À todos que estimo como verdadeiros amigos em especial Gabriela Porfírio (Xu), Márcia Barbosa (Bê) e Clauceane de Jesus (Glau), que sempre estiveram ao meu lado, contribuindo do início ao fim do projeto. Não teria palavras para agradecer a imensa gratidão que tenho a cada uma.

Às minhas mais que amigas e sim irmãs de coração Aline Cavalcanti e Adriana Bandeira, agradeço pelo carinho, palavras de confortos, coragem, incentivos e pelo verdadeiro sentimento de amizade ao qual nunca esquecerei.

Aos mestrandos, doutorandos, estagiários do Laboratório de Infectologia Veterinária e integrantes do Grupo de Estudo em Infectologia Veterinária, pelos momentos nas sessões científicas, ensinamentos e sabedoria compartilhada.

Aos mestrandos, doutorandos, estagiários do Laboratório de Alergia e Acarologia em especial Márcia Barbosa e Luciana Reboredo, por estarem sempre ao meu lado, contribuindo com o conhecimento e ensinamentos de acordo com as vivências práticas de cada uma.

À Silvana Salomão, que exerceu um papel fundamental no resgate de ninhadas caninas. Pessoa que admiro pela atividade como protetora da causa animal que executa com muita coragem e garra apesar das dificuldades.

À Diretoria e funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Camaçari e à toda equipe do Laboratório de Patologia da UFBA (residentes, funcionários e professores) pelo apoio e ajuda na busca por parasitos e toda colaboração para realização do projeto.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que contribuíram de alguma forma e apoiou para o desenvolvimento deste trabalho e a conquista desta vitória. MUITO OBRIGADO.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Obtenção de ovos de <i>T. canis</i> . A- Fêmeas grávidas de <i>T. canis</i> ; B- Fixação e dissecação; C- Úteros dissecados; D- Esvaziamento uterino para obtenção de ovos; E- Ovos de <i>T. canis</i> incubados em placas de Petri e em formol sob visualização em estereoscópio (Aumento de 10x).	28
Figura 2: Ovos de <i>T. canis</i> larvados sob visualização em estereoscópio em aumento de 10x (A) e culturas de larvas de <i>T. canis</i> em meio RPMI sob visualização microscópica com aumento de 100x (B).	29
Figura 3: Padronização da sensibilização de placas de poliestireno (96 poços) com concentrações diferentes de antígeno E/S de <i>T. canis</i> . Soro A – Amostra de animal positivo no parasitológico fecal apenas para <i>T. canis</i> (ovos e parasitos adultos em fezes). Soro B – Amostra de animal positivo no parasitológico fecal para <i>T. canis</i> , ancilostomídeos e <i>Trichuris sp.</i> Soro C – Amostra negativa.	35
Figura 4: Titulação em bloco para detecção de IgG anti- <i>T. canis</i> na padronização da diluição dos soros (1:1000 a 1:8000) e diluição do anticorpo secundário anti-IgG canino biotinizado (A - 1:2000, B - 1: 4000, C - 1:6000 e D - 1:8000) observados separadamente em cada gráfico de acordo com a diluição empregada em soro controle positivo para <i>T. canis</i> .	36
Figura 5: Padronização da absorção de soros com antígenos de <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Dipylidium caninum</i> , <i>Trichuris trichiura</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> em concentrações de 2mg, 4mg, 6mg, 8mg e 2x 4mg/mL em ensaio imunoenzimático indireto para detecção de IgG anti- <i>T. canis</i> .	39

- Figura 6: Reatividade de IgG anti-*Toxocara canis* em soros de cães por Elisa indireto usando como antígeno TcES larval, após absorções individuais dos soros com antígenos somáticos de *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum*.. 40
- Figura 7: Reatividade de IgG anti-*Toxocara canis* em soros de cães por Elisa indireto usando como antígeno TcES larval, após absorções dos soros com antígenos somáticos de *Ascaris lumbricoides*, duplas absorções (1ª em *Ascaris lumbricoides* e 2ª em *Ancylostoma caninum* ou *Dipylidium caninum*) e absorção tripla (todos os antígenos). 40
- Figura 8: Curva ROC obtida na padronização da técnica de ELISA indireto com antígeno E/S larval para detecção de IgG anti-*T. canis* em soros de cães. 42
- Figura 9: Prevalência de IgG anti-*T. canis* em 140 amostras de soros caninos usando como antígeno E/S de *T. canis* em teste de ELISA indireto após absorção dos soros com antígenos somáticos de *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum* 44
- Figura 10: Ovos e oocistos identificados em parasitológicos fecais de cães (A- Ovo de *T. canis*, B - Ovos de Ancilostomídeos C – Oocistos de *Cystoisospora* D- Ovo de *Trichuris sp*, E - Co-infecção de *Trichuris sp* com Ancilostomídeos e F - Co-infecção de *Trichuris sp* com *Toxocara canis*. (Aumento: A, C e D - 400x , B e E -100x e F - 40x). 47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Análise univariada da associação entre gênero e idade com soroprevalência de IgG anti- <i>T. canis</i> por ELISA em uma população canina em risco de infecção enteroparasitária, Salvador, Brasil, 2015..	45
Tabela 2: Frequência de infecções parasitárias individuais e mistas em 140 cães abrigados em instituição filantrópica de Salvador, Bahia, submetidos à avaliação coproparasitológica.	47
Tabela 3: Distribuição e Frequência de co-infecções parasitárias em cães abrigados em instituição filantrópica de Salvador, Bahia, submetidos à avaliação coproparasitológica..	48
Tabela 4: Distribuição e correlação da soropositividade canina para toxocariase em intervalos de densidades ópticas por grupos específicos obtidos com exames coproparasitológicos.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA-BA - Associação Brasileira Protetora de Animais da Bahia

Ag-E/S – Antígeno excretório/secretório de larvas de *T. canis*

APS - Ammonium Persulfate

BA- Bahia

CCZ - Centro de Controle de Zoonoses

Células Th - células T “helper”

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid ou ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

IFN- γ – Interferon gama

IgE - Imunoglobulina da classe E

IgG- Imunoglobulina da classe G

IgM- Imunoglobulina da classe M

IL – Interleucina

LAA- Laboratório de Alergia e Acarologia

LIVE – Laboratório de Infectologia Veterinaria

LMV - *larva migrans visceral*

LMO - *larva migrans ocular*

LMC - *larva migrans cutânea*

NAFS (Núcleos de Apoio à Saúde da Família)

OMS- *Organização Mundial da Saúde*

PBS- Phosphate buffered saline: Solução salina tamponada de fosfato

PBS-T - PBS contendo Tween 20 a 0,05%

PEG - Polietilenoglicol

pH- Potencial Hidroelétrico

PMSF-Phenylmethyl-Sulfonyl Fluoride

PSF- Programas de Saúde da Família

SDS-PAGE - eletroforese em gel com dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

RPM- Rotações por minuto

TEMED - Tetramethylethylenediamine

Th2 – célula T “helper” tipo 2

UFBA - Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. HIPOTESES DO TRABALHO	6
3. OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo Geral	7
3.2 Objetivos Específicos	7
4. REVISÃO DE LITERATURA	8
4.1 Aspectos gerais da epidemiologia da toxocaríase	8
4.1.1 Transmissão e capacidade infectante dos ovos de <i>T. canis</i>	8
4.1.2 Caracterização da infecção por <i>Toxocara canis</i> . Ciclo biológico	10
4.1.3 Contaminação ambiental	11
4.1.4 Frequência parasitária em cães	12

4.1.5	Soroprevalência de infecção por <i>T. canis</i>	13
4.2	Resposta imunológica dos hospedeiros a infecções helmínticas.....	14
4.2.1	Resposta imune específica à infecção por <i>T. canis</i>	15
4.3	Toxocaríase humana	16
4.4	Diagnóstico da toxocaríase humana.....	17
4.5	Toxocaríase canina	18
4.6	Diagnóstico da toxocaríase canina	19
4.7	Medidas de controle da toxocaríase e a interdisciplinaridade na Saúde Pública.....	20
5.	MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1	Seleção e caracterização da população canina estudada e aspectos éticos do estudo.....	23
5.1.1	Avaliação clínica e coleta de amostras biológicas dos animais.....	24
5.2	Exame coprológico	25
5.3	Obtenção de parasitos adultos.....	25
5.4	Produção de antígeno somático de <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Dipylidium caninum</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> e <i>Trichuris trichiura</i>	26
5.5	Produção de antígeno excretório/secretório de <i>T. canis</i>	27
5.5.1	Obtenção de ovos de <i>T. Canis</i>	27
5.5.2	Eclosão dos ovos de <i>T. canis</i>	28

5.5.3	Concentração e diafiltração do antígeno excretório – secretório de <i>T. canis</i>	29
5.6	Padronização de método para absorção de soros caninos com antígenos de <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Dipylidium caninum</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> e <i>Trichuris trichiura</i> ,.....	30
5.7	Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- <i>T. canis</i> em cão	31
5.8	ELISA indireto para determinação da soropositividade em soros caninos.....	32
5.9	Análise estatística.....	33
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
8.	REFERÊNCIAS	52
9.	ANEXOS	69

RESUMO

Diversos são os parasitos intestinais capazes de acometer cães e gatos, e destacam-se aqueles capazes de causar impacto na saúde pública por tratar-se de zoonoses. Dentre eles, o *Toxocara canis* e o *Toxocara cati*, agentes causadores das toxocaríases canina e felina respectivamente que são responsáveis pelas síndromes larva migrans visceral e ocular do homem. Os animais domésticos integram o ciclo evolutivo como hospedeiros definitivos criando focos de transmissão em ambientes comuns ao lazer humano. As infecções podem produzir uma gama de sinais clínicos que variam desde um quadro subclínico até a morte do animal. O propósito do presente estudo foi desenvolver um método de ensaio imunoenzimático de ELISA indireto com especificidade ótima para o diagnóstico de toxocaríase em cães, determinada pela absorção de imunoglobulinas que reagem cruzadamente com antígenos associados a outras parasitoses. Foram selecionados 140 cães em condições de risco de infecção para determinação da soroprevalência de toxocaríase através do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). Os resultados do ELISA foram comparados à frequência parasitária obtida por exames coprológicos pela técnica de Willes-Molay e Sedimentação espontânea. Para realização do ELISA indireto, padronizou-se o teste com antígeno excretório-secretório de *T. canis*, produzido a partir de larvas dos parasitos. Durante o desenvolvimento do método ELISA, foi incluída uma etapa em que amostras de soro foram absorvidas em antígenos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris sp.*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum* para minimizar a reatividade cruzada e aumentar a especificidade do teste. A análise parasitológica evidenciou 70,7% de amostras fecais positivas, distribuídas como infecções individuais por *Trichuris sp* em 28,57%, Ancilostomídeos em 9,29%, *T. canis* em 1,43%, Cystoisospora em 0,7%, além de infecções mistas. As condições ideais para realização da sorologia foram padronizadas, absorvendo as amostras com 4 mg/ml de antígeno somático dos demais parasitos, sensibilização com 3 µg/mL de Antígeno excretório/secretório de *T. canis*, diluições dos soros e anticorpo secundário em 1:1000 e 1:2000 respectivamente. A soroprevalência foi determinada em 61,4% (86/140), utilizando o ponto de corte de 0,275. A sensibilidade do teste ELISA foi determinada em 100% e a especificidade em 94,44%. Evidenciou-se, portanto, uma baixa positividade do exame parasitológico contrapondo-se à alta soropositividade de detecção de animais com toxocaríase. Assim, o ELISA desenvolvido no presente estudo contribui para atender ao necessário desenvolvimento de novos testes diagnósticos específicos, capazes de diagnosticar principalmente os animais em estágios subclínicos, devido ao impacto que podem acarretar à saúde pública. Concluímos que os exames sorológicos devem ser empregados para complementar o diagnóstico parasitário canino e principalmente auxiliar na elaboração de medidas profiláticas.

Palavras-chave: Toxocaríase, ELISA, caninos, soroprevalência, reatividade cruzada

ABSTRACT

There are several intestinal parasites able to affect dogs and cats, and stand out from those capable of causing public health impact because it is of zoonoses. Among them, *T. canis* and *T. cati*, causative agents of canine and feline toxocariases respectively, are responsible for the larva migrans syndromes visceral and ocular of humans. Domestic animals are part of the life cycle as definitive hosts becoming transmission focuses for the common human leisure environments. Infections can produce a range of clinical signs ranging from subclinical conditions to the death of the animal. The purpose of this study was to develop an ELISA immunoenzymatic assay method with good specificity for the diagnosis of toxocariasis in dogs, determined by the absorption of immunoglobulins which cross-react with antigens associated with other parasites. One hundred and forty dogs were selected in places with infection risk conditions to determine the seroprevalence of toxocariasis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The ELISA results were compared to parasitic frequency obtained by stool tests by Willes-Molay technique and spontaneous sedimentation. To perform the ELISA, standardization was performed by using excretory-secretory products of *T. canis* larvae as antigen. During the development of the ELISA, a step was included, in which serum samples were adsorbed with somatic antigens of *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris sp.*, *Dipylidium caninum*, *Ancylostoma caninum* to minimize cross-reactivity and increase the specificity of the test. The parasitological analysis resulted in 70.7% positive fecal samples, distributed as individual infections by *Trichuris sp* in 28.57%, Hookworms in 9.29%, *T. canis* in 1.43%, Cystoisospora 0.7%, and mixed infections (30, 7%). The optimum ELISA conditions were standardized as absorbing samples with 4 mg / mL of somatic antigen of other parasites; sensitizing wells with 3 µg/mL of Ag-E/S *Toxocara* and diluting sera and secondary antibody at 1: 1,000 and 1: 2,000 respectively. The seroprevalence was determined in 61.4% (86/140), using a cutoff value of 0.275. The sensitivity of the ELISA was of 100% and specificity of 94.44%. The different results between ELISA and parasitological tests obtained in the present study reflects the need for development of new specific tests able to diagnose mainly animals at subclinical stages due to the impact that may lead to public health. Therefore, the ELISA test that was developed in this work contributes as an useful method to complement the diagnosis of canine worm infections, so that to primarily assist in developing preventive measures.

Keywords: Toxocariasis, ELISA, canines, seroprevalence, cross-reactivity

1. INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias do trato gastrointestinal em cães são muito frequentes na rotina da clínica médica veterinária no Brasil. O diagnóstico clínico presuntivo seguido da prescrição de anti-helmínticos comerciais é uma prática bastante comum, embora muitas vezes seja associado à análise de achados laboratoriais em exames coprológicos (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007). Cães que apresentam sinais clínicos de infecções parasitárias são na maioria filhotes. Além do sistema imunológico dos cães jovens ser imaturo, alguns dos parasitos mais prevalentes em nosso país utilizam vias de transmissão que expõem especificamente recém-nascidos ou neonatos (RAMÍREZ-BARRIOS et al., 2004).

Muitas das doenças infecciosas parasitárias descritas são zoonoses. Assim, além da importância em medicina veterinária, o diagnóstico correto associado ao tratamento específico com drogas eficazes contra o patógeno é fundamental também para a saúde humana. Um aspecto relevante nesse contexto é evitar a resistência dos patógenos aos fármacos comumente utilizados na rotina clínica, tal como tem acontecido com antibióticos (MITREVA et al., 2007).

Os exames parasitológicos de fezes, embora sejam fundamentais para o diagnóstico das parasitoses intestinais, apresentam limitações quanto à sensibilidade diagnóstica. Os laboratórios comumente adotam a associação de técnicas para aumentar a sensibilidade da pesquisa de protozoários e helmintos (MEND ES et al., 2005). Dessa forma, os ensaios sorológicos, por indicarem indiretamente o contato do hospedeiro com o patógeno, através da detecção e quantificação de imunoglobulinas específicas circulantes, tornam-se uma alternativa para complementar as limitações inerentes aos exames parasitológicos. Além disso, a sorologia permite abordagens diagnósticas com objetivo de levantamento epidemiológico populacional, devido à praticidade metodológica e rapidez em oferecer resultados em larga escala.

O conhecimento da soroprevalência e dos fatores de risco para aquisição e manutenção das parasitoses nas regiões urbanas e rurais brasileiras é fundamental para a elaboração de medidas de controle que proporcionem o bem-estar animal e a manutenção da saúde pública. De fato, aspectos epidemiológicos das infecções parasitárias são objeto de

estudo de muitos autores, que buscam avaliar os fatores associados à frequência dos endoparasitos em diferentes regiões do mundo (RAMÍREZ-BARRIOS et al., 2004; FUNADA et al., 2007; PALMER et al., 2008; LITTLE et al., 2009). Entretanto, são escassos os estudos sobre levantamento soroepidemiológico de parasitos intestinais em animais de estimação nos estados brasileiros, mesmo sendo o Brasil um país de dimensões continentais e clima favorável a inúmeros parasitos. Na literatura científica brasileira existem algumas contribuições referentes ao estudo das enteroparasitoses de cães, cujos métodos são limitados à investigação da contaminação ambiental e sua influência na transmissão de parasitos aos humanos. Um trabalho recentemente desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa em Infectologia Veterinária com um protótipo do ELISA-toxocaríase demonstrou que a soroprevalência de IgG anti-*T. canis* pode atingir índices da ordem de 80% em cães de algumas localidades de Salvador, e que a pobreza é um importante fator de risco de aquisição e exposição de pessoas e animais à infecção (REGIS et al., 2011).

Na medicina veterinária, sobretudo de animais de estimação como os cães, poucas são as parasitoses cujo diagnóstico pode ser realizado por ensaio sorológico definido e padronizado, tal como pode ser aplicado no diagnóstico de infecções por *Neospora caninum* (BJORKMAN & UGGLA, 1999). Tal deficiência representa um fator limitante ao controle epidemiológico adequado dessas enfermidades.

Dessa forma, o objetivo principal do presente estudo foi padronizar e validar um ensaio sorológico (ELISA INDIRETO - Enzyme-linked Immunosorbent Assay) capaz de detectar imunoglobulinas G anti-*Toxocara canis* em soros de cães. Dessa forma, os resultados aqui obtidos contribuem com a ciência por disponibilizar um teste sorológico com fins diagnósticos para a clínica médica veterinária, aplicável tanto ao diagnóstico de rotina quanto a estudos epidemiológicos em helmintíases de cães.

Os testes imunológicos destinados ao diagnóstico de parasitoses, conforme descritos na literatura, apresentam limitações quanto à obtenção de antígenos de helmintos para diagnóstico pela detecção de anticorpos específicos. Isso ocorre devido ao compartilhamento de moléculas homólogas entre grupos taxonômicos próximos capazes de reagir cruzadamente nos ensaios. Embora as reações antígeno-anticorpo sejam específicas, em alguns casos os anticorpos induzidos mediante exposição prévia a

diferentes parasitos podem reagir cruzadamente, devido ao compartilhamento de epítomos de antígenos imunizadores. Tais reações cruzadas decorrem da semelhança estrutural ou química entre antígenos de patógenos de diferentes espécies (KINDT et al., 2006).

Para desenvolver o presente estudo, adotou-se como modelo a toxocaríase, por tratar-se de uma enfermidade zoonótica com graves consequências para a saúde pública. O *Toxocara canis*, é o agente causador das síndromes *larva migrans visceral* (LMV) e *larva migrans ocular* (LMO) em humanos. A presente abordagem experimental abrirá vias para que o método ELISA desenvolvido sirva também como base para a padronização de novos ensaios e diagnóstico de outras enfermidades parasitárias. Para validar o ELISA para toxocaríase, foi realizada a avaliação da reatividade de soros de cães soropositivos e negativos ao antígeno excretório/secretório de *T. canis* como controles para detectar e caracterizar possíveis reações cruzadas a antígenos somáticos de outros parasitos (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma caninum*, *Trichuris sp* e *Dipylidium caninum*). Tal avaliação incluiu a análise dos soros por meio da técnica de *Western blotting*. Ressaltamos que os métodos utilizados para reconhecimento das reações cruzadas poderão ser aplicados à padronização futura de ELISAs específicos para diagnóstico de várias outras parasitoses.

2. HIPÓTESES DO TRABALHO

I – Antígenos isolados de enteroparasitos de cães, como o *Toxocara canis*, podem ser utilizados em método ELISA indireto para diagnóstico sorológico da infecção.

II – O ELISA padronizado com antígeno de larvas de *T. canis* viabiliza o diagnóstico de animais negativos em exames coproparasitológicos e sem manifestações clínicas sugestivas de infecções parasitárias.

III - Helmintos de grupos taxonômicos distintos compartilham moléculas antigênicas com *T. canis*, interferindo cruzadamente em ensaios sorológicos.

IV- A especificidade do método ELISA para diagnóstico de *T. canis* pode ser aprimorada através da identificação e absorção de anticorpos causadores de reações cruzadas em soros-teste com antígenos de outros parasitos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um método de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto com elevada especificidade para o diagnóstico de toxocaríase em cães, determinada pela restrição da reação a frações proteicas que não reajam cruzadamente com antígenos associados a outras parasitoses.

3.2. Objetivos específicos:

- I- Padronizar um ensaio imunoenzimático indireto para diagnóstico sorológico de toxocaríase canina: ELISA-toxocaríase com antígeno excretório secretório de *T. canis*.
- II- Investigar a ocorrência de reação cruzada de soros caninos entre antígenos de *Toxocara sp* e antígenos de outros parasitos no ELISA.
- III- Aplicar o ELISA-toxocaríase em uma análise comparativa entre os resultados da sorologia versus exame coprológico em cães em condições de risco de aquisição de infecções enteroparasitárias.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Aspectos gerais da epidemiologia da toxocaríase

Mais de 10 espécies podem ser identificadas sob o gênero *Toxocara*, contudo apenas *Toxocara canis* e *Toxocara cati* são descritos como agentes etiológicos da toxocaríase em humanos (SALINAS et al., 1987). As primeiras descrições de doenças causadas por *Toxocara* sp. em humanos foram realizadas em 1950 por Wilder e em 1952 por Beader, e, desde então, essa enfermidade cosmopolita vem sendo citada na literatura científica mundial (DESPOMMIER, 2003).

4.1.1. Transmissão e capacidade infectante dos ovos de *T. canis*

A infecção humana por *T. canis* ocorre pela ingestão de ovos larvados presentes em solos, fômites, mãos contaminadas com fezes de animais parasitados (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007) e alimentos crus ou preparados sem higiene (OVERGAAUW, 1997). A geofagia é um fator comumente associado à ocorrência de toxocaríase em crianças (SCHANTZ, 1989). O pêlo de cães e gatos constitui um foco de infecção, que ocorre pelo contato direto com animais infectados (AYDENIZO-ZOZKAYHAN et al., 2008). Destaca-se, também, a transmissão por ingestão de vísceras de hospedeiros paratênicos (suínos, galinhas), cruas ou preparadas sem higiene adequada, ou em virtude de hábitos culturais (TAIRA et al., 2004).

Caracterizados como hospedeiros definitivos, os cães infectam-se pela ingestão de ovos embrionados oriundos de fezes de cães infectados em praças, praias, áreas de lazer, jardins e parques públicos (CAPUANO et al., 2006). Os cães podem ainda adquirir a infecção pelas vias trans-placentária, trans-mamária, e, em menor intensidade, mediante ingestão de tecidos de hospedeiros paratênicos contendo larvas de *T. canis* (SPRENT, 1963; GLICKMAN & SCHANTZ, 1981; OVERGAAUM et al., 1997).

Embora frequências de infecção maiores sejam encontradas em cães jovens, animais adultos susceptíveis também contribuem com o surgimento de novos casos e elevação dos números estatísticos da toxocaríase, devido à eliminação contínua de ovos no meio

ambiente, principalmente as cadelas grávidas (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007). Independentemente de faixa etária, raça e sexo do hospedeiro, todos são susceptíveis à infecção ao haver contato com uma fonte infecciosa (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002; ROBERTSON & THOMPSON, 2002; RAMIREZ-BARRIOS et al., 2004; FONTANARROSA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2006). A maior frequência de *T. canis* tem sido encontrada, entretanto, em cães mais jovens que seis meses de idade, e uma razão para isso é a imaturidade do sistema imunológico. Após o nascimento, por até 3 a 4 semanas, filhotes de cadelas infectadas não eliminam ovos de *T. canis* no ambiente; somente após este período, o ciclo completa-se e então os cães passam a eliminar os ovos a serem encontrados no material fecal (ROBERTSON & THOMPSON, 2002).

Cada fêmea de *Toxocara* é capaz de produzir cerca de 25.000 a 200.000 ovos diários, eliminados junto ao conteúdo fecal de animais domésticos, em ambientes públicos ou domiciliares. Apesar dessa alta contaminação em solos, condições ideais são necessárias para que haja o amadurecimento e embrionamento. No ambiente, os ovos podem permanecer viáveis por vários meses, a depender das condições climáticas e do tipo de solo, até que a temperatura e a umidade favoráveis permitam a continuidade do processo de embrionamento. O desenvolvimento de ovos de *T. canis* é mais eficiente em solos do tipo argiloso, principalmente quando não há exposição permanente ou direta à luz solar, que exerce efeito deletério sobre as larvas (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981; LESCANO, 1998). Os ovos tornam-se inviáveis quando submetidos a temperaturas inferiores a -15°C , porém a maturação cessa em temperaturas abaixo de 10°C (SCHANTZ & GLICKMAN, 1983; OVERGAAUW, 1997). Nas condições ideais, após 2 a 6 semanas, 85% dos ovos eliminados nas fezes tornam-se infectantes, ou seja, apresentam-se embrionados com larvas do segundo estágio, que corresponde ao estado infectante. Estruturalmente, os ovos de *T. canis* apresentam-se sob formato semigloboso visualizável sob microscopia em aumento de 100 vezes. Sua casca espessa confere resistência às adversidades ambientais e variados agentes químicos, consequentemente viabilidade por longos períodos.

4.1.2. Caracterização da infecção por *Toxocara canis*. Ciclo biológico.

Os canídeos são considerados os hospedeiros definitivos do *T. canis*, incluindo os silvestres, como lobos e raposas. Os cães domésticos, entretanto, são hospedeiros mais importantes devido ao seu contato próximo ao homem e ao tamanho da população canina (ANDRADE, 2010).

Uma vez no intestino delgado do cão, os ovos sofrem ação do suco gástrico, o que facilita a eclosão larval. As larvas atravessam a parede intestinal, passam pela veia porta ou vasos linfáticos e alcançam o fígado, coração e pulmões. No pulmão, os bronquíolos são rompidos pelas larvas, que chegam à traqueia, de onde são deglutidas por desencadarem produção de secreção e reflexo da tosse, retornando ao intestino delgado. No intestino canino, o parasito desenvolve-se para a forma adulta capaz de produzir diariamente os ovos. Esse ciclo é desenvolvido em 3 a 4 semanas. No ambiente externo, em 2 a 5 semanas sob condições favoráveis, os ovos tornam-se infectantes (SCHANTS, 1989; SANTARÉM et al., 2009).

Um aspecto importante do ciclo desses ascarídeos é que as larvas podem entrar em um estágio de hipobiose, em que podem ficar dormentes nos tecidos ou órgãos de animais infectados, mesmo que eles tenham sido tratados com vermífugos. Em condições específicas, sob estímulo de hormônios da gestação ou outras modificações metabólicas gestacionais, as larvas encapsuladas nos tecidos maternos são reativadas. As larvas ativas migram, atravessando a placenta para infectar o feto, ou a glândula mamária para infectar o recém-nascido via aleitamento (URQUHART et al., 1996; REGIS et al., 2011).

O homem e hospedeiros paratênicos participam do ciclo biológico de forma acidental, sendo o quadro patológico apresentado por esses hospedeiros decorrente da característica biológica dos ascarídeos de se manter em tecidos extra-intestinais (SANTARÉM et al., 2009).

4.1.3. Contaminação ambiental

A presença de animais errantes e os hábitos de pessoas em passear com seus animais de estimação em áreas públicas são elementos associados à contaminação ambiental por ovos, oocistos, larvas e parasitos adultos em estudos realizados no Brasil (QUEIROZ et al., 2006; CAMPOS-FILHO et al., 2008; CHIEFFI et al., 2008; SANTARÉM et al., 2009). Os mesmos elementos são referidos em estudos internacionais (ABE & YASUKAWA, 1997; GIACOMETTI et al., 2000; CHIODO et al., 2006), à exceção de áreas geográficas acima de 60° de latitude norte (VERONESI, 2007).

Na Ásia, Wiwanitkit & Waenlor (2004) encontraram a frequência de 5,71% de ovos de *T. canis*, ao analisar 175 amostras de solos em parques públicos. Alonso et al. (2000) ao analisar 475 amostras de solo coletadas de parques públicos, caixas de areia de escolinhas e residências, estimaram a contaminação em 1,3% em uma cidade subtropical da Argentina. Foram encontrados índices de contaminação ambiental com ovos da ordem de 42,2% em Havana, Cuba (DUMENIGO & GALVEZ, 1995), 75% em Osaka, no Japão (ABE & YASUKAWA, 1997), 64% em Ancona, na Itália (GIACOMETTI et al., 2000), 38% em Toulouse, na França (FERRÉ & DORCHIES, 2000), 67% em Murcia na Espanha (YBANEZ et al., 2001), ou 30,6% em Ankara, na Turquia (OGE & OGE, 2000).

Devido às condições favoráveis do Brasil, um país tropical de dimensões continentais, a presença de ovos de *T. canis* em zonas urbanas e rurais pode ser intensa. Estudos de levantamento ao longo de todo território nacional resultaram em achados variáveis. No Nordeste, em Salvador, Bahia, Alcântara-Neves e colaboradores (1989) encontraram 18,4% de amostras positivas em solo de praças públicas e areia de praias contaminadas com ovos de *Toxocara sp.* Em 2006, Santos e colaboradores (2006), também em Salvador, constataram que 45% de 816 amostras de areia de praia eram positivas para ovos de *T. canis*. Na região Sul, ovos de *Toxocara sp* foram isolados em 60% das 15 localidades públicas avaliadas em Londrina/PR (CHIEFFI & MÜLLER, 1976). Araújo et al. (1999), ao avaliar contaminação com fezes de cães em 74 praças públicas de Campo Grande/MS (Centro Oeste do país), encontraram o índice de 10,8%. Em um assentamento rural, localizado na região sudeste de São Paulo, foram encontrados 29% de contaminação por ovos de *Toxocara sp.* (SANTARÉM et al., 2009). Em Lavras/MG,

as praças foram consideradas como locais de maior nível de presença de ovos de *Toxocara sp.* em comparação com outros ambientes urbanos (GUIMARÃES et al., 2005). Os vários autores têm concluído que medidas precisam ser adotadas devido ao risco zoonótico dessas infecções helmínticas. Considera-se também que tais índices epidemiológicos podem ser minimizados, desde que medidas preventivas efetivas sejam adotadas, dentre elas o isolamento e a separação física de áreas destinadas à recreação de pessoas ou de animais, a prevenção da ocorrência de animais errantes pela castração, a educação adequada e a ampliação de serviços veterinários à população (REGIS et al., 2011).

4.1.4 Frequência parasitária em cães

A infecção tem sido relatada em cães de todo o mundo, sendo mais prevalente em países cujas condições higiênico-sanitárias são mais precárias, a população enfrenta mais carências e a vermifugação de cadelas prenhes e filhotes é menos praticada (DUBEY, 1978). Estudos em exames parasitológicos de fezes de cães mostram que o *Toxocara* é um dos vermes mais encontrados. Um estudo sobre a prevalência global de parasitos em cães de Praga, República Tcheca, indicou 6,2% de infecções por *T. canis* (DUBNÁ et al., 2007). Em Taipei, Taiwan, 15% de amostras de fezes de cães de rua eram positivos para diversos parasitos (FAN et al., 2005). Na Zâmbia, África, reportaram-se índices equivalentes de 11% de infecções por *T. canis* em estudos de prevalência de helmintíases em 452 amostras caninas de áreas urbanas e rurais (BWALYA et al., 2011). Nos Estados Unidos, América do Norte, 2,2% de 1.199.293 de amostras fecais de cães foram positivos para ascarídeos (LITTLE et al., 2009). Na Venezuela, a prevalência encontrada em 614 amostras foi de 11,4% (RAMÍREZ-BARRIOS et al., 2004). Na Argentina, 11% em 2193 amostras de cães (FONTANARROSA et al., 2006). Em São Paulo, infecções foram confirmadas em 5,5% das 271 amostras fecais avaliadas (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002). Em Botucatu, reportaram-se 17,37% de positividade em 1012 amostras fecais caninas (TORRICO et al., 2008). Em Monte Negro, Rondônia, 18,9% das 95 amostras avaliadas foram diagnosticadas como positivas (LABRUNA et al., 2006). Na cidade do Rio de Janeiro, encontrou-se 8,8% de amostras fecais contaminadas com ovos de *T. canis* (VASCONCELLOS et al., 2006).

No Balneário do Cassino, Rio Grande do Sul, um estudo de avaliação de ovos e larvas de helmintos, observou-se 9,3% de *T. canis* em amostras de cães errantes (SCAINI et al., 1999). No município de Ribeirão Preto, evidenciou-se prevalência de 24,2% em 331 *pools* de material fecal canino, coletados em áreas públicas (CAPUANO et al., 2006). Em Itabuna, foi relatado 4,2% de positividade em 119 amostras fecais de praças públicas (CAMPOS-FILHO et al., 2008). MATOS et al. (1979) analisaram 1609 amostras fecais de cães, na cidade de Salvador-Bahia, nos anos de 1970 e 1978, obtendo frequência de 10,9% e 19,3% respectivamente.

4.1.5. Soroprevalência de infecção por *T. canis*

Estudos soropidemiológicos sobre a toxocaríase têm sido realizados em humanos com diversas faixas etárias, para demonstrar a positividade para anticorpos anti-*T. canis* em amostras de diferentes regiões geográficas. O método ELISA indireto utilizando como antígenos os produtos excretórios/secretórios das larvas de *T. canis* (Ag – E/S) (DE SAVIGNY et al., 1979) e absorção de soros com antígenos somáticos de *Ascaris lumbricoides* para maximizar a especificidade (LYNCH et al., 1988) tem sido citado e verificado nos estudos a seguir. Os índices encontrados de soropositividade variam de acordo com a região avaliada. Na Alemanha, Europa, 4,8% de um grupo de doadores de sangue foram positivos. A soroprevalência encontrada no Oeste Europeu correspondeu a 17,7% (KIMMING et al., 1991). No País Basco, Europa, a soroprevalência em crianças da classe média foi de 4,4%, enquanto que em crianças com baixo poder aquisitivo, a positividade alcançou 65,7% (CILLA et al., 1996). AJAYI et al. (2000), na Nigéria, realizaram um dos estudos pioneiros na África, evidenciando uma prevalência de 29,8%. Em Chengdu, China, Luo et al. (1999) relataram 17,7%. No Peru, América do Sul, Espinoza et al (2008) encontraram uma positividade sorológica de 32,4% em crianças em idade escolar. Na Argentina, América do Sul, uma investigação epidemiológica demonstrou soropositividade de 31,6% (FILLAUX et al., 2007).

Resultados de estudos soropidemiológicos em humanos também são reportados sobre o Brasil, havendo achados que variam de 3% a 65%, conforme os descritos a seguir: 21,8% (66/302) e 3% (9/300) em Brasília, na avaliação de dois grupos de crianças

pertencentes a classes sociais distintas (JUNIOR et al., 2003); 54,8% (114/208) no Rio de Janeiro (TONELLI, 2005); 32,2% (386/1199) no Paraná (MARCHIORO et al., 2011); 18,9% (214/1131) em Goiânia (SANTOS et al., 2009); e 67,2% (405/604) em São Paulo (KANAMURA et al., 2003). Na Bahia (Salvador), reporta-se estudos com soropositividades de 48,4% em crianças (700/1445) (MENDONÇA et al., 2012), de 46,0 % em doadores de sangue (DATOLLI et al., 2010) e 65,0 % em adultos moradores no bairro da Paz (SOUZA et al., 2011).

Em cães, o trabalho pioneiro de Regis e colaboradores (2011) avaliou a soropositividade para IgG anti-*T. canis* em Salvador, em 301 amostras pertencentes ao Bairro da Paz, bairro caracterizado por carência socioeconômica. Os autores encontraram 82,7% de cães soropositivos utilizando um teste ELISA com antígenos de *T. canis* e soros absorvidos com antígeno somático de *Ancylostoma caninum*

4.2. Resposta imunológica dos hospedeiros a infecções helmínticas

A resposta imune às infecções helmínticas inclui mecanismos variados devido ao tamanho e diversidade metabólica de cada parasito. As células e proteínas do sistema imune constituem a principal forma de defesa do organismo contra infecções sistêmicas por essa classe de parasitos (MACHADO et al., 2004). Por sua vez, os parasitos desenvolvem mecanismos de evasão ao sistema imune do hospedeiro por meio dos quais conseguem sobreviver por longos períodos (NEVA & BROWN, 1994). Moléculas secretadas/excretadas por larvas assim como o tegumento de ecdises durante a fase migratória são apontadas como sendo um importante mecanismo de escape dos helmintos ao sistema imune (DESPOMMIER, 2003).

Embora o sistema complemento e outros fatores da resposta imune natural possam contribuir para a defesa contra a infecção por helmintos, a resposta imune específica com a produção de anticorpos e citocinas é determinante para a eliminação do parasito e cura do hospedeiro (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2005). Células T CD4+ do tipo 2 são produtoras de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, que dentre outras funções induzem a produção de imunoglobulinas E (IgE) por linfócitos B e ativam eosinófilos, mastócitos e

basófilos que são componentes fundamentais na defesa contra helmintos (ELSE & FINKELMAN, 1998). Através da ligação de imunoglobulinas da classe IgE a basófilos circulantes ou mastócitos teciduais, mediadores químicos, dentre eles a histamina, são liberados e promovem a reação de hipersensibilidade imediata capaz de destruir o tegumento de helmintos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2005). Eosinófilos ativados por mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpo também atuam na destruição de parasitos (MACDONALD et al., 2002). A IL-4 e a IL-13 promovem o aumento da secreção de mediadores da inflamação, da produção de muco e da contratilidade da musculatura intestinal, facilitando a expulsão dos vermes adultos (FINKELMAN, 1997). Na fase aguda das parasitoses, além dos mediadores de inflamação, há liberação de citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 associada à deposição de imunocomplexos nos tecidos. O hospedeiro apresentará, assim, manifestações clínicas como febre, astenia, perda de peso, dor abdominal, diarreia e tosse, além de complicações como pleurite e pericardite (BUTTERWORTH, 1998). Na fase crônica, observa-se redução das manifestações clínicas, decorrente do efeito modulador exercido pela IL-10, cuja produção é induzida por ovos dos helmintos (GRZYCH et al., 1991).

4.2.1. Resposta imune específica à infecção por *T. canis*

A resposta imune desencadeada por ação do *T. canis* nos tecidos do hospedeiro é caracterizada pela presença de células T CD4⁺ em meio a achados de acentuada reação inflamatória (ELSE & FINKELMAN, 1998). Ocorre produção predominante de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, do tipo Th2. Essas citocinas estimulam a diferenciação de células B, que produzem IgG e IgE específicas para o parasito e causam elevação dos níveis humorais de IgE total e de eosinófilos (RUBINSKY-ELEFANT et al., 2006). Durante o desenvolvimento e migração das larvas, o fator excretado/secretado de *T. canis* (TES) é capaz de desencadear reação inflamatória (MAGNAVAL et al., 1992). Sendo constituído por um conjunto de glicoproteínas, o Ag-E/S apresenta também grande potencial de imunomodulação. Isso é possível devido a trocas sucessivas da cutícula larval, com conseqüente liberação de moléculas proteicas que permitem ao parasito a capacidade de evasão ao sistema imune. (LOUKAS et al., 2001). As dificuldades impostas à resposta imune humoral e celular do hospedeiro, que

viabilizam fortemente a susceptibilidade à infecção, estão associadas a disfunções de células fagocíticas, à deficiência de complemento, à deficiência na produção de anticorpos e à indução de clones de células T com funções comprometidas (JANEWAY, 2007).

4.3. Toxocaríase humana

A partir da determinação da fisiopatogenia por Paul Beaver e colaboradores (1952), a toxocaríase humana foi denominada síndrome *larva migrans* visceral (LMV), recebendo atenção científica que resultou nos primeiros estudos (SOUSA et al., 2008). Outros parasitos também são capazes de produzir sinais clínicos compatíveis com a síndrome LMV em seres humanos, a exemplo do *Ancylostoma caninum* (ARAÚJO et al., 1999; GENNARI et al., 1999). Por essa razão, Beaver, em 1969, definiu o conceito da síndrome LMV para os casos caracterizados pela migração ativa e principalmente persistência de larvas vivas por longos períodos em hospedeiros intermediários. Nos tecidos dos hospedeiros paratênicos não ocorrem mudanças de estágios larvais, nem o parasito atinge maturidade, mas as larvas permanecem vivas e migram em órgãos internos. Assim desenvolve-se a fisiopatologia da larva migrans visceral (LMV) como também da larva migrans ocular (LMO) (SANTARÉM et al., 2009).

Clinicamente, na maioria das vezes as infecções são leves e, portanto, assintomáticas, caracterizadas por eosinofilia persistente (BEAVER, 1972), alta produção de IgE específica e policlonal. Entretanto, estas formas se associam com imunomodulação do hospedeiro (ALCÂNTARA-NEVES, et al., 2014). Nas formas clínicas sintomáticas, durante a migração pode haver o desenvolvimento de hemorragia, necrose, inflamação eosinofílica e formações de granulomas. Em tais casos, os sinais observados mais comumente incluem alterações respiratórias e disfunção hepática, podendo haver quadros sistêmicos de hipersensibilidade. A toxocaríase ocular é caracterizada pelo desenvolvimento de estrabismo e uveíte. Essas patologias frequentemente culminam com perda visual progressiva parcial ou total em decorrência de endoftalmite eosinofílica com formação de granuloma, geralmente unilateral, que pode ser ainda confundido com retinoblastoma (SANTARÉM et al., 2009). Esses sinais são mais

comuns em crianças de 2 a 5 anos de idade, faixa etária mais acometida por toxocaríase por ser mais exposta à ingestão de ovos por geofagia (ROBERTSON et al., 2000; KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007). As manifestações clínicas no homem estão diretamente relacionadas com a carga parasitária, frequência de reinfecções, distribuição das larvas em tecidos, e intensidade da resposta inflamatória aguda (SCHANTZ, 1989). Fatores como a sensibilização do hospedeiro por antígenos como os produtos secretados e/ou excretados pela larva estão diretamente ligados à patogênese da toxocaríase (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981; SCHANTZ & GLICKMAN, 1983). Apesar de não ser causadora frequente de óbitos em humanos, a toxocaríase produz alergias, diarreias, anemias, alterações respiratórias (sibilância e asma), urticária, hepatomegalia (SCHANTZ, 1991), além de alterações neurológicas como confusão mental e convulsões, associadas com vasculite cerebral (SANTARÉM et al., 2009).

4.4. Diagnóstico da toxocaríase humana

O diagnóstico da toxocaríase em humanos pode basear-se em um conjunto de dados epidemiológicos, laboratoriais e manifestações clínicas. À semelhança do que ocorre na fase de encistamento larval em cães, o exame parasitológico fecal não pode ser empregado em humanos. Em humanos e outros hospedeiros paratênicos, o ciclo não completa-se, portanto esses hospedeiros não eliminam ovos nas fezes (SANTARÉM et al., 2008). As alterações mais comuns em exames laboratoriais de humanos com toxocaríase incluem leucocitose, em grande parte devido à eosinofilia, e aumento das globulinas séricas associado a títulos elevados de IgG e IgM. Assim, a sorologia constitui o melhor método de diagnóstico por detectar elevação nos níveis circulantes de imunoglobulinas anti-*T. canis* (ANDRADE, 2010). Métodos diretos não podem ser facilmente empregados, devido à migração das larvas nos tecidos. Entretanto, a análise histopatológica para diagnóstico de toxocaríase larval pode ser realizada em busca de padrões de deposição de antígenos em infecções agudas ou de granulomas em torno de larvas (OVERGAUW, 1997). Exames de imagens tais como ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética podem auxiliar na localização dos granulomas (SANTARÉM et al., 2009).

O diagnóstico sorológico pode ser realizado por meio das técnicas de hemaglutinação indireta, imunofluorescência direta ou indireta, radioimunoensaio e testes imunoenzimáticos. O ensaio imunoenzimático indireto (ELISA do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) é o mais empregado em estudos soropidemiológicos e no imunodiagnóstico (GLICKMAN et al., 1987; MINVIELLE et al., 2000). O ELISA baseado em proteínas excretadas/secretadas por larvas sob cultivo “in vitro” (TES/TcES) mostrou ser a técnica com melhor sensibilidade e especificidade (DE SAVIGNY, 1975; DE SAVIGNY et al., 1979; VAN KNAPEN et al., 1983). O método é aplicado à detecção de IgG específica no soro, fluidos oculares ou liquor (SANTARÉM et al., 2009). ELISAs com sensibilidade variando de 73% a 91% e especificidade de 86% a 95% vêm sendo desenvolvidos por diversos pesquisadores. Alguns estudos referem padronizações de ELISAs com sensibilidade e especificidades elevadas, chegando a alcançar 100% (GLICKMAN et al., 1978; JACQUIER et al., 1991).

A especificidade dos ensaios sorológicos pode ser melhorada mediante absorção prévia dos soros em antígenos de outros parasitos. Durante o processo de absorção, anticorpos que podem reagir cruzadamente com antígenos de outros parasitos e de *T. canis* são eliminados através de incubação prévia dos soros a serem testados com uma preparação solúvel contendo antígenos somáticos dos parasitos em questão. O procedimento, que antecede a fase de reação propriamente dita com antígenos de *T. canis*, permite evitar diagnósticos falsos positivos, principalmente em regiões com altas prevalências para enfermidades causadas por *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura* e *Enterobius vermiculares* (LYNCH et al., 1988).

4.5. Toxocaríase canina

Em cães, a toxocaríase é observada na forma aguda em filhotes de até 4 semanas de idade. Os cães adultos podem apresentar-se infectados, porém com prevalência menor de doença clínica, devido ao estado de hipobiose parasitária. Havendo um fator desencadeante, a exemplo de doenças concomitantes que interfiram com a homeostase do sistema imunológico do cão, reinicia-se o ciclo hepatotraumático e então as larvas chegam à forma adulta intestinal e passam a eliminar ovos (SANTARÉM et al., 2009).

O ciclo pulmonar, também chamado ciclo evolutivo clássico, ocorre nos cães em torno dos três meses de idade. Os cães que passam por estados críticos da infecção podem recuperar-se por completo e expulsar os parasitos de seus intestinos nos primeiros 6 meses de vida. A eosinofilia é considerada a alteração hematológica mais consistente em quadros de toxocaríase. Dentre as manifestações clínicas destacam-se inapetência, diarreia, flatulência, vômitos algumas vezes com presença do parasito, distensão abdominal, desidratação, retardo no crescimento, tosse, pneumonia associada à migração larvária e até quadros de septicemia e consequente óbito do animal (URQUHART et al., 1996, SANTARÉM et al., 2009; SOUZA et al., 2008).

4.6. Diagnóstico da toxocaríase canina

No cão, o diagnóstico baseia-se na análise coproparasitológica para pesquisa de ovos esféricos de coloração preto-acastanhado, invólucro espesso e escavado (OVERGAUW & VAN KNAPEN, 2008), não embrionados e medindo 75x90µm de diâmetro sob microscopia em aumento de 100 x (HENDRIX, 1998). O parasito adulto pode estar presente em fezes e até mesmo em vômito. As técnicas mais utilizadas para exame fecal são Willis-Molay e Sedimentação, assim como no diagnóstico de outras helmintíases em caninos (HOFFMANN, 1987). Durante a fase em que as larvas estão encistadas e sem atividade migratória, o exame fecal não é capaz de detectar a infecção. O diagnóstico, nesse caso, torna-se possível por meio de ensaios indiretos para pesquisa de anticorpos específicos circulantes (OVERGAAUW, 1997).

Assim, a espécie em evidência no presente estudo é o *Toxocara canis*, que apresenta a classificação taxonômica: Reino (Animalia), Filo (Nematoda) Classe (Secernentea), ordem (Ascaridida) Família (Ascarididae) e Gênero (*Toxocara*). Para análise de reatividade cruzada selecionamos espécies de helmintos mais frequentes em cães: *Ancylostoma caninum* (Filo – Nematoda, Classe – Secernentea, Ordem – Strongylida, Família- Ancylostomidae), *Trichuris trichiura* (Filo- Nematoda, Classe Adenophorea, Ordem – enoplida, Família Trichuridae) e *Dipylidium caninum* (Filo – Platyhelminthes, Classe – Cestoda, Ordem - Cyclophylidea, Família – Dipylidiidae).

Todos os ensaios sorológicos para diagnóstico de infecção por *T. canis* em humanos são realizados após absorção prévia dos soros-teste em antígenos de *Ascaris lumbricoides* (*Filo* – Aschelminthes, *Classe* – Secernentea, *Ordem* – Ascaridida, *família* – Ascarididae), para minimizar reações cruzadas conforme descrito em diversos estudos. Com objetivo semelhante, essa medida foi aplicada na padronização e validação dos ensaios sorológicos por ELISA indireto em cães do presente estudo. Apesar dos cães não se infectarem com *Ascaris lumbricoides*, eles podem se infectar com o *Toxascaris leonina* que filogeneticamente é muito próximo a este nematelminto.

O interesse no desenvolvimento de ensaios mais específicos vem sendo evidenciado na descrição de testes sorológicos com antígenos recombinantes (IDAWELA et al., 2007) ou imunotestes histopatológicos com anticorpos monoclonais capazes de reconhecer epítomos específicos de *T. canis* (De BRITO et al., 1994). Além disso, foram demonstrados métodos moleculares como a PCR (reação em cadeia da polimerase), para investigar o genoma de *T. canis* com o mesmo objetivo (MAIZELS et al., 2000). Nosso grupo já publicou um inquérito sorológico sobre toxocaríase canina utilizando os produtos secretados/excretados por larvas do *T. canis* (REGIS et al., 2011). Entretanto os soros foram absorvidos apenas com antígenos de *Ancylostoma caninum*. A limitação do ensaio quanto à especificidade nos incentivou a realizar o presente estudo.

4.7. Medidas de controle da toxocaríase e a interdisciplinaridade na Saúde Pública

O controle e a prevenção da emergência das zoonoses parasitárias requerem a formação e interação de equipes multidisciplinares que devem visar à saúde pública de forma integral. Há necessidade de controlar contaminações em lugares públicos por fezes de cães e gatos por meio da educação para guarda responsável e higiene, além da ampliação dos serviços veterinários à população. Tais medidas só serão realmente eficazes se houver interatividade entre profissionais promotores da saúde e da educação (SANTARÉM et al., 2009). Dentre esses profissionais, o médico veterinário desempenha um papel importante no controle e na promoção da saúde pública. Esse profissional é dotado do conhecimento e treinamento específico capaz de intervir na transmissão, ciclos biológicos, epidemiologia e profilaxia de patógenos zoonóticos. Há

necessidade de abordagem educativa profissional dessa importante função dos médicos veterinários para que eles não abstenham-se de atuar como agente promotor de saúde pública. Tal abstenção ocorre, por exemplo, quando esses profissionais limitam-se ao diagnóstico clínico presuntivo de enteroparasitoses, deixando de requisitar exames coprológicos e prescrevendo indiscriminadamente parasiticidas em suas práticas de rotina (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007). A terapêutica e profilaxia adotada por médicos veterinários têm como base o uso de drogas anti-helmínticas. O tratamento em geral é repetido num intervalo de 15, 21 ou 30 dias conforme o ciclo biológico de cada parasito, grau de infecção no animal ou base farmacológica adotada. Devido ao uso inadequado de vermífugos, o sucesso terapêutico oscila, o que contribui para a indução de resistência às drogas, sendo necessária a introdução de novos medicamentos no mercado (MITREVA et al., 2007; SANTARÉM et al., 2009).

O protocolo anti-helmíntico deve visar à prevenção do desenvolvimento de larvas de nematódeos para a fase adulta e, assim, evitar a eliminação de ovos no ambiente, uma vez que não existe vacina capaz de prevenir a infecção por *T. canis* em cães (SANTARÉM et al., 2009). Dessa forma, segundo a biologia do parasito, os filhotes devem ser vermifugados na segunda, quarta e sexta semanas de vida. Tal indicação é também recomendada pela OMS, sendo o início a partir da segunda semana de vida, quando as fêmeas do parasito iniciam a produção de ovos (BARRIGA et al., 1988).

O fármaco de eleição para tratamento da toxocaríase em cães é o fenbendazol, na dosagem de 20 a 50mg/kg, a depender de suas condições clínicas. Outros princípios ativos como o pamoato de pirantel (5mg/kg) ou nitroscanato (50mg/kg), também são indicados (SANTARÉM et al., 2009). Nos quadros clínicos associados a migração de larvas, o processo inflamatório é tratado com anti-inflamatórios esteroidais, não esteroidais, anti-histamínicos e broncodilatadores (MAGNAVAL et al., 2001; SOUSA et al., 2008). Em humanos, o tratamento à base de anti-helmínticos – albendazol, tiabendazol ou ivermectina – é recomendado sempre que haja eosinofilia persistente, acentuada, associada ao quadro clínico.

Em países atentos à saúde pública, a participação do médico veterinário em cargos de Conselhos de Saúde Pública é registrada, a exemplo desde 1848 na França e 1900 na Nova Zelândia em 1900, cujo cargo de direção do Departamento Nacional de Saúde

Pública era ocupado por médico veterinário (HATSCHBACH, 2004). A partir de 1944, intensificou-se a indicação de contratação de Médicos Veterinários para cargos de consultores e promotores na área de Saúde Pública, pela Organização Panamericana de Saúde (VIANNA PAIM & CAVALCANTE DE QUEIROZ, 1970). Verifica-se a presença desse profissional na história da Saúde Pública dos Estados Unidos da América, a partir da nomeação do cargo de Conselheiro Veterinário no Conselho de Saúde da cidade de Nova York, entre os anos de 1873 e 1901 (OSBURN, 1996).

De acordo com a atuação do médico veterinário na saúde pública, três áreas de destaque são abordadas: Vigilâncias Epidemiológica, Sanitária e Ambiental. Em 2002, um Comitê de Especialistas em Saúde Pública Veterinária da OMS reconheceu que algumas áreas emergentes de atuação do Médico Veterinário em Saúde Pública podem trazer contribuições significativas para a saúde das populações: Vigilância Epidemiológica e controle de doenças comunicáveis não zoonóticas; Análise de aspectos sociais, comportamentais e mentais de relação entre seres humanos e animais; Prevenção e estudo epidemiológico de doenças não infecciosas; Análise e avaliação dos serviços e programas utilizados na Saúde Pública (HATSCHBACH, 2004).

Os programas de saúde da família (PSF), na maioria dos municípios do Brasil, são constituídos por equipes das diversas áreas de saúde. Recentemente, em 2011, o Ministério da Saúde do Brasil aprovou a inclusão do médico veterinário nas novas especialidades profissionais NAFS (Núcleos de Apoio à Saúde da Família). Além das atividades de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças nos animais, o médico veterinário tem muito a contribuir na educação para saúde, especialmente na prevenção de doenças parasitárias zoonóticas nesses programas. As atividades educativas devem ser focadas em ações para o controle de parasitoses como medidas de higiene, separação entre áreas destinadas ao lazer de animais de estimação e de crianças, guarda responsável que inclui controle da reprodução de animais de estimação e recolhimento de fezes durante caminhadas em áreas públicas (BARRIGA, 1988; CHOMEL, 2008).

Entretanto, para que medidas de abrangência em Saúde Pública sejam bem-sucedidas, é fundamental que métodos diagnósticos efetivos sejam disponíveis, assim como o domínio do conhecimento sobre a biologia dos patógenos e a fisiopatologia das infecções.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Seleção, caracterização da população canina estudada e aspectos éticos do estudo

Usou-se como critério para seleção de cães positivos habitar em locais com risco de infecção, sendo selecionados cães pertencentes a abrigos de animais abandonados, cujas condições higiênico-sanitárias, localização e estrutura do espaço fossem favoráveis à instalação e manutenção de enteroparasitoses nos cães. Assim foi selecionada a população canina de uma instituição filantrópica com objetivo de acolher animais errantes ou abandonados, localizada em Salvador, bairro Paripe (subúrbio ferroviário a noroeste da cidade). A instituição, durante o estudo, abrigava cerca de 250 cães, distribuídos em 47 canis, geralmente em número superior a um cão por canil, podendo chegar a até 8 animais, além de gatos, resgatados em diversos bairros da cidade.

Nessa instituição, o número de animais abrigados oscilava frequentemente, à medida que animais, em sua maioria, filhotes, eram adotados em feiras promovidas semanalmente ou pela constante introdução de novos animais resgatados ou abandonados próximo a instituição. Todos os animais eram alimentados uma vez ao dia, com ração seca das mais variadas marcas, desde rações de baixas qualidades até rações super-premium quando adquiridas por doações.

Ao chegarem ao abrigo, muitos animais apresentavam infestações por ectoparasitos (carrapato e pulgas). Há uma tentativa de manutenção preventiva de parasitoses por parte da instituição, a exemplo do uso de fipronil (Frontline®, Merial, França / Top-line®, Merial, Brasil). Os animais são também vacinados com vacina múltipla canina conjugada com anti-rábica (EURICLAN® CHPLR, Merial, SAS França) e recebem vermifugação com produto comercial à base de pamoato de pirantel, febantel e praziquantel (MAXI VERM, Konig, Brasil). O reforço das vacinas é feito anualmente, contudo vermifugação somente é repetida quando observada formas adultas de parasitos nas fezes dos animais ou mediante as doações. Sempre que qualquer animal chega a instituição é feita uma avaliação clínica com médico veterinário, realizado exames complementares (fezes, sumário de urina e hemograma) e encaminhado a quarentena até que qualquer risco à saúde dos demais animais seja descartado. Embora essas medidas

sejam tomadas e diariamente todos os canis são higienizados em água corrente associada a água sanitária e sabão, as condições de reinfecção são altas.

Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela comissão de ética no uso de animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, sob o protocolo nº 19/2011.

5.1.1. Avaliação clínica e coleta de amostras biológicas dos animais.

Foram selecionados 140 caninos de forma aleatória, por sorteio, independente de sexo, raça ou faixa etária para composição do grupo a ser estudado e determinação de soroprevalência de toxocaríase. Todos os animais passaram por avaliação clínica em que foram examinados o estado corporal, hidratação, mucosas, tempo de preenchimento capilar, temperatura, análise do sistema tegumentar, cavidade abdominal por palpação e auscultação cardio-pulmonar (Ficha clínica – Anexo 1).

As coletas de sangue e fezes foram todas realizadas no período da manhã, para que todas as amostras pudessem ser processadas ainda no mesmo dia. Cerca de 5mL de amostras de sangue periférico foram coletadas de todos os animais, através de punção da veia jugular ou em alguns casos veia cefálica, com tubo à vácuo sem anticoagulante. As amostras foram mantidas no gelo até processamento no Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE) localizado no Hospmev-UFBA, para separação de soro e estocagem a -20° C até o uso.

Amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal de cada animal, mediante a palpação retal ou realização de enema com tampão fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico, acondicionadas em coletor universal estéril, devidamente identificado e sob refrigeração até o processamento e análise coproparasitológica no LIVE.

5.2. Exame coprológico

Foram adotadas as técnicas de sedimentação, Willis-Mollay e microscopia direta conforme descritas na literatura (WILLIS, 1921; KATARIGI e OLIVEIRA-SIQUEIRA, 2007) para pesquisa de ovos, formas adultas de nematódeos gastrointestinais e oocistos de protozoários. As amostras foram analisadas por no máximo 48h após a coleta. A técnica de flutuação passiva, pelo método de Willis, foi realizada com solução saturada de açúcar, pesando 2 gramas do material fecal homogeneizado em tamis (dispositivo em forma de funil cuja extremidade menor é fechada com uma malha porosa resistente), submetidos a um intervalo de 15 minutos com sobreposição de uma lamínula sob tubos de ensaio contendo o homogeneizado fecal, até que a leitura da amostra sob microscopia óptica (objetivas de 10x e 40x) fosse realizada.

O método de sedimentação simples foi realizado utilizando duas gramas de fezes, filtradas em tamis. As fezes assim preparadas foram acondicionadas em tubos plásticos de 50 mL (TPP, Suíça) e deixadas em repouso por uma hora para sedimentação. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi submetido a sucessivas lavagens em intervalos de mesmo período até que o sobrenadante ficasse claro (4 a 6 lavagens em média). Para leitura, foi adicionada uma gota de lugol e cada lâmina examinada em microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x. Por se tratarem de métodos qualitativos, os resultados foram expressos em positivo ou negativo. O resultado foi considerado positivo quando pelo menos um ovo de nematódeo ou oocisto de coccídeo era visualizado. Os gêneros/espécies de nematódeos foram identificados de acordo com os caracteres morfológicos de seus ovos.

5.3. Obtenção de parasitos adultos

Para produção de antígeno somático, cadáveres de cães necropsiados no Laboratório de Patologia do Hospital de Medicina Veterinária (UFBA) e no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Camaçari foram submetidos à separação e exame de todo o trato gastrointestinal para pesquisa de vermes adultos. Os vermes adultos obtidos, *Ancylostoma sp.*, *Dipylidium caninum* e *Trichuris sp.*, foram imediatamente lavados em

solução fisiológica estéril e conservados a -70°C até a produção de antígeno somático. Exemplos de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* foram cedidos por grupos colaboradores do Laboratório de Alergia e Acarologia a partir de hospedeiros humanos.

Formas adultas de *T. canis* foram obtidas através da captura de ninhadas caninas de bairros com população economicamente carente e com infraestrutura precária em Salvador/BA. Cães com 45 a 60 dias receberam cloridrato de piperazina tetraidratado (PROVERME, Tortuga, Brasil) na dose de 100mg/kg e 4,0ml de óleo mineral imediatamente após o vermífugo. Vermes adultos foram coletados até 48h após a vermifugação em conteúdo fecal ou vômito dos filhotes, que foram mantidos no Hospmev – UFBA até adoção. Fêmeas adultas de *T. canis* foram lavadas em água corrente e conservadas em solução fisiológica em frascos plásticos de 200 mL (TPP, Suíça) a -4°C até o procedimento para obtenção de ovos.

Ascaris lumbricoides e *Trichuris trichiura* foram obtidos de crianças previamente vermifugadas com pamoato de pirvínio (Pyr Pam, Uci Pharma, Brasil) na presença de dulcolax (relaxante intestinal).

Todos os vermes obtidos foram lavados exaustivamente em solução salina fisiológica e criopreservados a -70°C até o uso.

5.4 Produção de antígeno somático de *Ascaris lumbricoides*, *Dipylidium caninum*, *Ancylostoma caninum* e *Trichuris trichiura*.

Antígenos somáticos de diferentes helmintos foram produzidos para investigação de reatividade cruzada com *T. canis*. Para tanto, dois gramas de parasitos adultos (*Ascaris lumbricoides*, *Dipylidium caninum*, *Ancylostoma caninum* e *Trichuris trichiura*) foram colocados em uma placa de Petri separadamente e cortados transversalmente em pequenos fragmentos com 10 mL de PBS, pH 7,4. Todo o conteúdo foi transferido para um tubo plástico de 50 mL (Falcon, TPP, Suíça), adicionado 25 μL para cada grama de parasito de coquetel inibidor de proteases (Sigma, USA). A trituração com homogeneizador de tecidos foi realizada em 5 ciclos de 5 minutos e intervalo de mesmo período com choque térmico em nitrogênio líquido prévio (5 a 10 ciclos de 30 segundos

com intervalo de 30 segundos). As suspensões de parasitos foram centrifugadas a 13 500 X g por 10 min e o sobrenadante congelado a - 20°C.

Para dosagem proteica dos antígenos somáticos, foi empregado o método de Lowry (Lowry et al., 1951). Através de funções logarítmicas ideais de acordo com as densidades ópticas obtidas em cada antígeno (Anexo 2), definiu-se as dosagens proteicas de *A. caninum*, *T. trichiura*, *A. lumbricoides* e *D. caninum* em 4,2 mg/mL, 6,6 mg/mL, 21 mg/mL e 23,9mg/mL respectivamente.

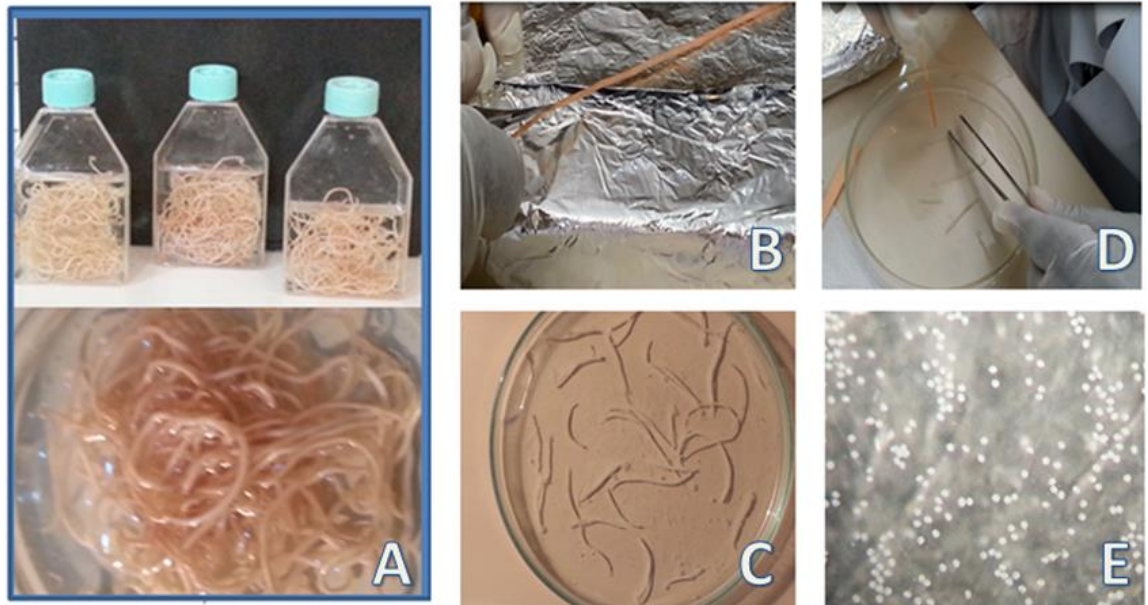
5.5. Produção de antígeno excretório/secretório de *T.canis*

O antígeno E/S de *T. canis* foi produzido para detecção de imunoglobulina anti-*T. canis* em soro de cães através de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). O método de obtenção do antígeno foi realizado de acordo com Alcântara-Neves et al. (2008), modificado a partir da técnica descrita por de Savigny (1975).

5.5.1 Obtenção de ovos de *T. canis*.

Para obtenção dos ovos, cada fêmea do verme foi fixada com agulhas hipodérmicas de 4/10 mm em placas, dissecadas na presença solução salina fisiológica, para umidificação e facilitar sua abertura longitudinalmente com tesoura de dissecação oftálmica. Posteriormente, cada útero foi colocado em placa de Petri para esvaziamento sob agitação e obtenção de ovos que foram incubados por 28-35 dias em formaldeído a 4% até o embrionamento (Figura 1).

Figura 1: Obtenção de ovos de *T. canis*. A- Fêmeas grávidas de *T. canis*; B- Fixação e dissecação; C- Úteros dissecados; D- Esvaziamento uterino para obtenção de ovos; E- Ovos de *T. canis* incubados em placas de Petri e em formol sob visualização em estereoscópio (Aumento de 10x).



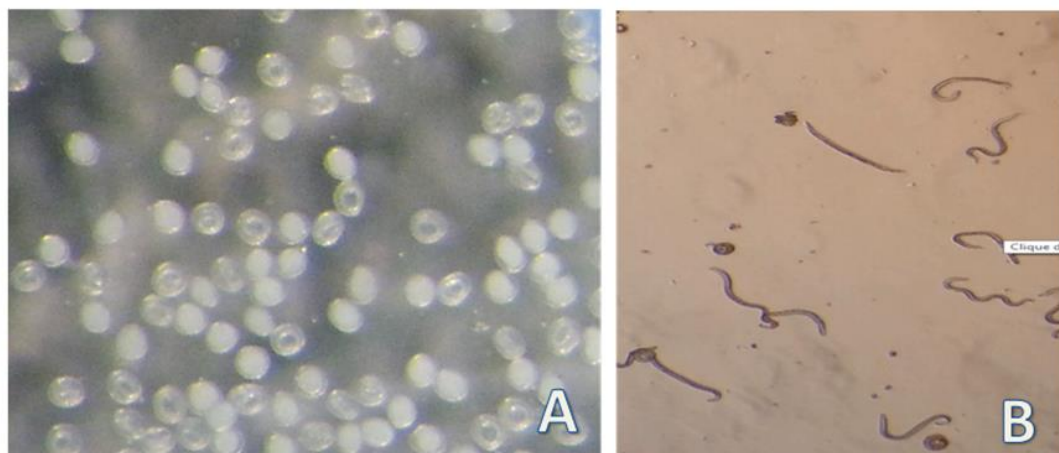
Fonte: Arquivo Pessoal

5.5.2 Eclosão dos ovos de *T. canis* e obtenção de larvas

Os ovos foram mantidos em condições que permitiram a sua eclosão (condições ambientais de temperatura e pressão comuns) e obtenção das larvas de *T. canis*. Após o período de incubação, os ovos foram transferidos da placa para um tamis de poliestireno (poros de 20 micrômetros) e lavados três vezes com água destilada para retirada do formaldeído. Em seguida, os ovos foram ressuspensos em hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos com a finalidade de retirar a membrana mamilonada (decorticação), seguidos de lavagem abundante em água destilada para retirada de qualquer resíduo de cloro. Em seguida, a suspensão de ovos foi transferida para um tubo plástico de 50 mL (Falcon, TPP, Suíça) e centrifugada a 6750 X g por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento contendo os ovos foi transferido para garrafas plásticas de cultura de 60 mL (TPP, Suíça) com pérolas de vidro e solução salina autoclavada, para eclosão com movimentos circulares para rompimento da membrana do ovo. A eclosão foi confirmada após visualização por microscopia de larvas em movimento (Figura 2). Um tamis foi montado acima de um cálice de sedimentação e sobre um Becker com

água a 45°C até tocar o tamis. Através de geotropismo as larvas viáveis migram do tamis para o fundo do cálice, formando o precipitado. As larvas foram transferidas para frascos de cultivo de células contendo 5 mL de meio RPMI suplementado com anfotericina (2,5µg/mL), gentamicina (100µg/mL) e glutamato (50µl), em estufa de CO₂ a 5 % e temperatura de 37°C. A cada 3 a 5 dias, todo conteúdo era centrifugado (6750 X g por 10 minutos a 25 °C), coletado sobrenadante, estocado a – 20°C para produção do Ag-E/S. O sedimento formado contendo as larvas, foi ressuspensão em novo meio suplemento e incubado pelo mesmo período para coletas posteriores do conteúdo excretório secretório a partir de larvas de *T. canis*. As larvas permaneceram viáveis por aproximadamente três meses.

Figura 2: Ovos de *T. canis* larvados sob visualização em estereoscópio em aumento de 10x (A) e culturas de larvas de *T. canis* em meio RPMI sob visualização microscópica com aumento de 100x (B).



Fonte: Arquivo Pessoal

5.5.3 Concentração e diafiltração do antígeno excretório – secretório de *T. canis*:

O Ag-E/S das larvas de *T. canis* presente no sobrenadante da cultura foi concentrado em aparelho de ultrafiltração - Diaflo® (Ultrafiltration Membranes – Amicon, INC). Trezentos mililitros do sobrenadante das culturas contendo o Ag-E/S das larvas de *T. canis* foram adicionados ao circuito de ultrafiltração Amicon®, acrescido de inibidor

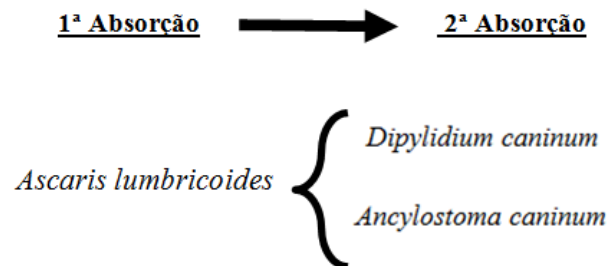
de proteases (PMSF-Phenylmethyl-Sulfonyl Fluoride). O aparelho contendo o Ag-E/S foi mantido em câmara fria a 4°C, acoplado a um agitador e cilindro de nitrogênio a pressão de 2 atm. À medida que o volume diminuísse para aproximadamente 15 mL, o conteúdo era transferido para um aparelho de ultrafiltração de 10 mL para realização de nova filtração até que restassem apenas 4 a 5 mL de produto final. Todo o conteúdo final de Ag-E/S foi transferido para uma membrana de diálise por 12 horas, a - 4°C, em um erlenmeyer para que a membrana ficasse imersa em solução de PBS acrescido de PMSF (0,01M) e azida (0,1%). No dia seguinte o líquido da diálise foi trocado 2x, sendo que o último líquido continha apenas o PBS 1X e PMSF. A dosagem de proteína do antígeno, revelou, segundo o método de Lowry, 310 µg/mL de proteína.

5.6. Padronização de método para absorção de soros caninos com antígenos de *Ascaris lumbricoides*, *Dipylidium caninum*, *Ancylostoma caninum* e *Trichuris trichiura*.

A absorção dos soros seguiu-se a técnica segundo de Savigny (1975) com a finalidade de eliminar anticorpos associados a reação cruzada entre anticorpos anti-*Ancylostoma*, anti-*Ascaris*, anti-*Trichuris* ou anti-*Dipylidium*. O ensaio de padronização de absorção das amostras de soro foi realizado utilizando concentrações variadas de 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL, 8mg/mL e dois ciclos de absorção de 4mg/mL para cada antígeno. Os soros testados (20µL) na padronização foram absorvidos com PEG (polietilenoglicol), acrescido dos antígenos nas quantidades acima, PBS (pH 7.4) quando preciso e azida a 0,1% para conservação do soro. Os soros absorvidos, agora diluídos em 1:5, foram colocados em um homogeneizador por 30 minutos a -4°C. O soro foi centrifugado a 13,500 X g por 10 min. Após a etapa de centrifugação, aproximadamente 80µL de sobrenadante foram recuperados de cada amostra. Os soros foram conservados a -20°C até a realização do ELISA.

Antes de serem submetidas ao ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) vinte (20) amostras de soros de cães positivos em exame fecal para um ou mais parasitos, foram selecionadas aleatoriamente para investigação da reatividade cruzada entre *T. canis* e demais possíveis alérgenos comuns capazes de interferir nos ensaios. Sendo assim, após a padronização do método de absorção, todas amostras foram absorvidas isoladamente

com 4mg de *Ascaris lumbricoides*, *Dipylidium caninum*, *Ancylostoma caninum* e *Trichuris trichiura*. Doze (12) amostras aleatoriamente selecionadas foram submetidas a absorção por meio de um “coquetel” (preparado contendo todos os antígenos) e também às absorções consecutivas, ou seja, absorvidas primariamente com *Ascaris lumbricoides* e posteriormente com antígeno diferenciado conforme abaixo:



5.7. Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*T. canis* em cão

O teste ELISA indireto para detecção de IgG de cão anti-*T-canis* foi realizado segundo a técnica preconizada por De Savigny (1975) e modificada por Mendonça e colaboradores (2013). Soros-padrão foram coletados de acordo com os seguintes critérios: os padrões positivos foram soros coletados de cinco cães não vermifugados, não vacinados, que tivessem tido contato com animais errantes, com sintomatologia clínica compatível com verminose e com resultados positivos em exame parasitológico fecal para *T. canis*; os soros negativos foram coletados de cinco cães vermifugados, submetidos a exames e consulta veterinária periódicos, vacinados com vacinas de rotina anti-rábica e múltipla canina, alimentados com ração de boa qualidade e principalmente negativos ao parasitológico fecal.

Placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Costar 3590, USA), foram sensibilizadas com 3µg por poço de Ag-E/S de *T. canis* em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubadas por 12h, a 4° C. O bloqueio foi feito com soro fetal bovino (SFB) a 10% em PBS contendo 0,05% de Tween (PBS-T) (180 µl/poço) por 1 hora. Para incubação das amostras foram usados quatro soros, sendo três controles positivos e um negativo. Soros não absorvidos foram diluídos a 1:1000, 1:2000, 1:4000,

1:5000 e 1:8000 em diluente SFB a 2,5%, enquanto que as amostras absorvidas foram diluídas a 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000 e 1:1600 (100 µl/poço em duplicata de cada amostra, incubadas no intervalo de 1 hora). Dois tipos de anticorpos secundários foram testados, anti-IgG canina conjugada a peroxidase e anti- IgG canina biotilado. As diluições testadas para os anticorpos secundários foram de 1:2000, 1:4000, 1:6000 e 1:8000 (adicionados 100 µL/poço sob incubação de 1h). Foi acrescentada a estreptavidina-peroxidase na diluição a 1:1000 em diluente (100 µL/poço, incubação de 30 minutos). Entre todas as etapas, lavou-se a placa por 3 vezes com PBS-Tween 0,05% e mais uma vez com PBS, pH 7,4. Para revelação, usou-se 6,25mL de água destilada, 3,05mL de ácido cítrico a 0,1M, 3,20mL de fosfato de sódio a 0,2M, 5mg de OPD (Orto-Phenileno-Diamino) e 5µl de peróxido de hidrogênio. O ensaio foi bloqueado com 25 µL/poço de ácido sulfúrico 4N (H₂SO₄). A leitura das densidades ópticas foi realizada no leitor de ELISA (espectrofotômetro) em filtro de 450nm.

5.8 ELISA indireto para determinação da soropositividade em soros caninos

A soroprevalência para toxocaríase foi determinada pelo exame de 140 soros de cães expostos a helmintoses, absorvidos previamente com os antígenos somáticos (*Ascaris lumbricoides*, *Dipylidium caninum*, *Ancylostoma caninum* e *Trichuris trichiura*) na concentração de 4mg/mL, conforme o item 5.6.

Para realização do ELISA, placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Costar 3590, USA) foram sensibilizadas com Ag-E/S de *T. canis* na concentração de 3µg/mL diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0.1M, pH 9.6 (100µl/poço), incubadas por 12 horas a -4°C. Entre cada etapa do ensaio, as placas foram lavadas 3x com PBS-T 0,05% seguidas por mais uma lavagem com PBS, pH 7.4. Após incubação, o bloqueio foi realizado com 180µl/poço de SFB à 10% diluído em PBS-Tween 0.05% por 1h. Amostras de soro com e sem absorção, foram adicionadas na diluição de 1:1000 e 1:200 respectivamente (100µl/poço) por 1h. Seguiu-se adição do anticorpo secundário (anti-IgG canino/Biotilado) na diluição de 1:2000 (100µl/poço), incubadas por 1h, seguidas da adição de estreptavidina na diluição de 1:1000 em diluente para incubação por 30 min. As diluições ótimas dos soros e do conjugado foram determinadas pelo ensaio de

padronização e as demais etapas, de revelação, parada e leitura em espectrofotômetro, conforme descrito no item 5.7.

5.9 Análise estatística

Para determinação das frequências parasitárias em exames coprológicos, os dados foram analisados descritivamente, seguindo os métodos de cálculo de percentagem.

Através do programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, Califórnia, EUA), foram analisadas:

- 1- A reatividade cruzada do antígeno excretório-secretório de *Toxocara canis* com antígenos somáticos de outros helmintos. Três testes de normalidade foram empregados para análises dos dados (Kolmogorav- Smivov test, D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test e Shapiro-Wilk Normality Test) e para comparação entre os grupos foi utilizado o teste t-student pareado.
- 2- O poder discriminatório dos ELISAs foi determinado por meio de curva ROC, bem como seleção da sensibilidade e especificidade calculadas a partir de diferentes pontos de corte.

Para investigação de associação entre gênero e idade com soropositividade *para T. canis*, realizou-se teste chi-quadrado e análise univariada, através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences de NIE, HULL & BENT, 2004) versão 16.0 com estimação de Odds Ratio e intervalo de confiança de 95%. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises com $p < 0,05$.

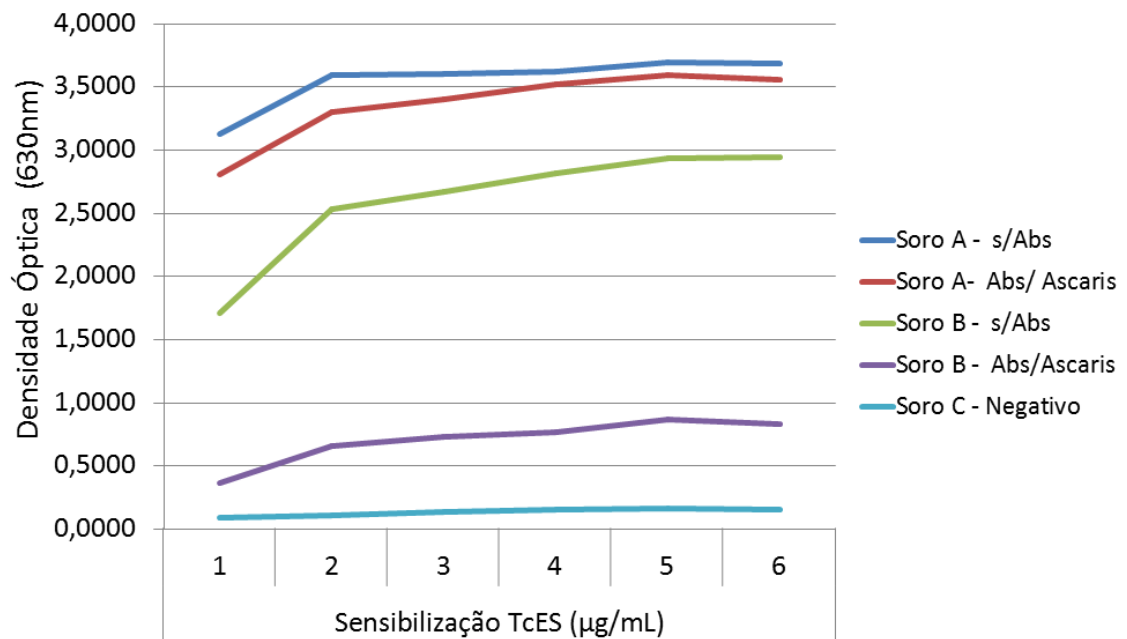
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi padronizado um ensaio baseado no método ELISA indireto para diagnóstico sorológico de toxocaríase canina, usando como antígeno produtos excretados/secretados por larvas de *T. canis*, incluindo uma etapa de absorção dos soros-testes com antígenos somáticos de outros parasitos. O método ELISA padronizado foi então utilizado na avaliação de 140 cães selecionados aleatoriamente entre uma população canina em risco de infecção, abrigados em uma instituição filantrópica, na cidade de Salvador, Bahia. A análise das amostras desses animais permitiu determinar a frequência das principais parasitoses examinadas por métodos parasitológicos e a soroprevalência para toxocaríase canina.

O antígeno definido para a padronização do ELISA baseou-se na literatura, que reporta que os produtos excretados/secretados por larvas de *T. canis* apresentam características antigênicas que conferem ao método alta sensibilidade e especificidade (DE SAVIGNY, 1975; DE SAVIGNY et al., 1979). Métodos semelhantes já foram descritos para uso no imunodiagnóstico tanto em cães (TORINA et al., 2005; MARTINEZ-BARBOSA et al., 2008; REGIS et al., 2011) como em humanos (GLICKMAN et al., 1986; MINVIELLE et al., 2000; MENDONÇA et al., 2013). Descrevem-se na literatura também ensaios sorológicos com antígeno somático preparado a partir de extrato bruto de *T. canis* (MARTINEZ-BARBOSA et al., 2008) assim como usando antígeno recombinante (MOHAMAD et al., 2009). Os métodos descritos acima, apesar de apresentar melhores especificidades ao longo do tempo de acordo com as adaptações e aprimoramentos efetuados, ainda demonstram baixa sensibilidade, o que requer busca de condições que confirmem maior acurácia ao diagnóstico.

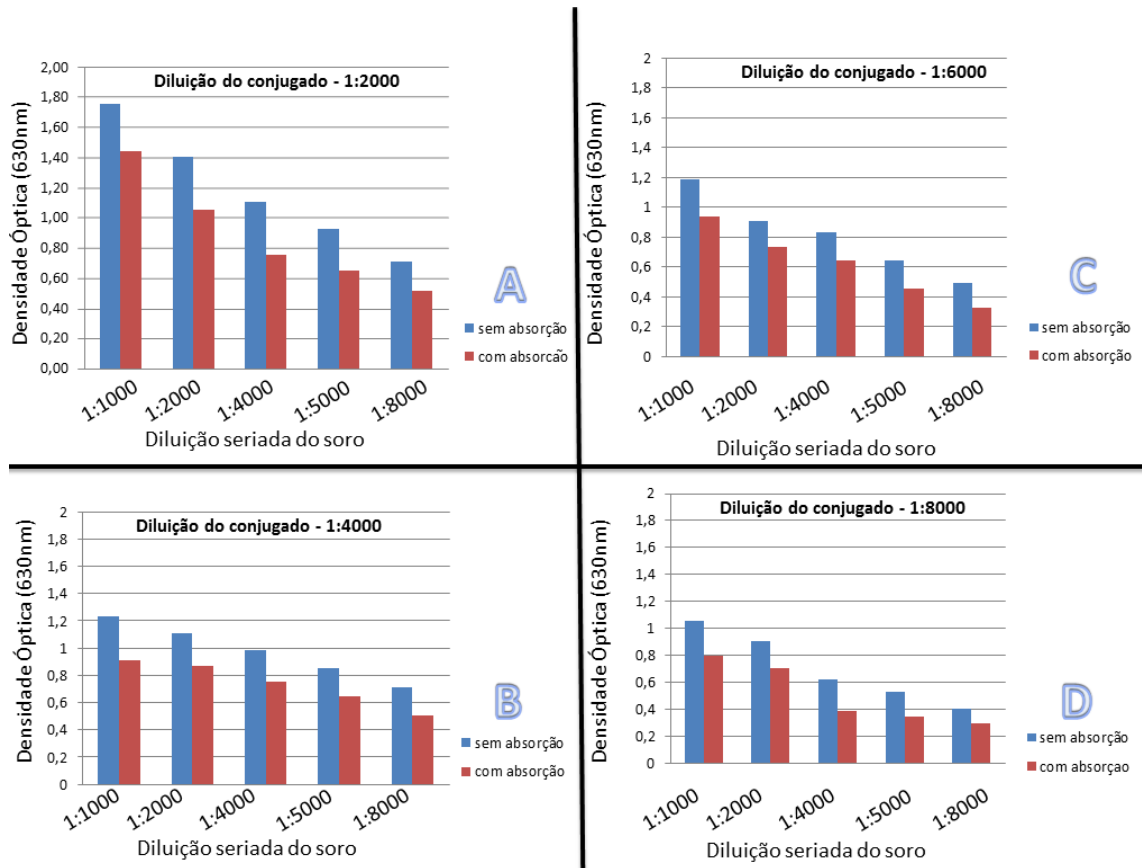
Para padronização dos ensaios no presente estudo, sensibilizou-se placas com concentrações diferenciadas de antígeno E/S para definição da melhor concentração (1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL e 6 µg/mL) a ser usada no diagnóstico por detecção indireta de imunoglobulinas anti-*T. canis*. A concentração ótima foi definida como 3µg/mL (Figura 3).

Figura 3: Padronização da sensibilização de placas de poliestireno (96 poços) com concentrações diferentes de antígeno E/S de *T. canis*. Soro A – Amostra de animal positivo no parasitológico fecal apenas para *T. canis* (ovos e parasitos adultos em fezes). Soro B – Amostra de animal positivo no parasitológico fecal para *T. canis*, ancilostomídeos e *Trichuris sp.* Soro C – Amostra negativa



O método ELISA foi padronizado por titulação em bloco com soros controles comprovadamente positivos e absorvidos em *Ascaris lumbricoides*, em diluições dos soros a 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:5000, 1:8000. Como anticorpo secundário, foi utilizado o anti-IgG canino conjugado com biotina produzido em coelho (Imuny Biotechnology, Campinas, Brasil), nas diluições de 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000. As placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Costar, Brasil) foram sensibilizadas com 3µg/mL de antígeno E/S de larvas de *T. canis* (Figura 4).

Figura 4: Titulação em bloco para detecção de IgG anti-*T. canis* na padronização da diluição dos soros (1:1000 a 1:8000) e diluição do anticorpo secundário anti-IgG canino biotilado (A - 1:2000, B - 1: 4000, C - 1:6000 e D - 1:8000) observados separadamente em cada gráfico de acordo com a diluição empregada em soro controle positivo para *T. canis*.



As condições ideais do ELISA indireto para teste de soros caninos foram estabelecidas em 3,0 μ g/mL de antígeno TcES para sensibilização, diluição dos soros a 1:1000 e de conjugado biotilado a 1:2000. Tais condições condizem com ensaios padronizados em humanos, realizados segundo técnica já descrita (De Savigny, 1975), em que valores próximos foram encontrados, sendo anticorpo e diluição dos soros iguais e antígenos na concentração de 3,2 μ g/ml (MENDONÇA et al., 2012). Com algumas diferenças, os autores Regis e colaboradores (2011), definiram na padronização do ELISA indireto para diagnóstico de toxocaríase em cães, a concentração do antígeno em 3,2 μ g/ml, a diluição dos soros em 1:3500 e do conjugado/peroxidase a 1:2000. No presente estudo, foi padronizada a diluição dos soros em 1:1000. Devido ao fato da etapa de absorção

envolver diluições, foi escolhido anticorpo secundário (anti-IgG canino) biotilado, pois o mesmo é capaz de intensificar em até quatro vezes mais a reação, do que quando usado anticorpo secundário conjugado à peroxidase.

A obtenção de antígenos específicos constitui a principal limitação da maioria dos testes imunológicos usados no diagnóstico de enfermidades (SUDRÉ, et al., 2006). Preparações antigênicas para testes diagnósticos devem ser capazes de detectar níveis séricos de anticorpos exclusivos para o patógeno em questão. Embora reações antígeno-anticorpo sejam altamente específicas, existem casos em que um anticorpo induzido pode reagir de maneira cruzada com antígenos não imunizantes. A reatividade cruzada deve-se à existência de compartilhamento de moléculas homólogas entre grupos taxonômicos diferentes (KINDT et al., 2006), ou seja, quando antígenos diferentes compartilham epítomos idênticos, com propriedades químicas similares ou que sejam estruturalmente semelhantes ao epítomo imunizante.

Dois tipos de antígenos naturais de *Toxocara* podem ser produzidos, antígeno somático e antígeno excretório-secretório do segundo estágio larval. O primeiro, formado a partir de moléculas que compõem o corpo do parasito, apresenta menor importância diagnóstica, por apresentar maior reatividade cruzada e compartilhamento de epítomos antigênicos com outros parasitos (GLICKMAN et al., 1986; PEIXOTO et al., 2011). O segundo, composto por uma mistura complexa de glicoproteínas produzidas e eliminadas pelo parasito durante sua fase larval, parece ser adequado para o diagnóstico da doença, principalmente devido à exposição dos hospedeiros a essas diversas moléculas durante o ciclo biológico do parasito (MAIZELS, 2013). A análise química do antígeno larval revelou que as moléculas mais consistentemente imunogênicas são a N-acetilgalactosamina e a galactose enquanto que outras moléculas tais como arabinose, manose, N-acetilglicosamina, glicose, xilose, não são tão frequentes, mas estão presentes também na formação de epítomos (MEGHJI e MAIZELS, 1986).

A padronização do ELISA incluiu uma etapa de absorção dos soros a serem testados com antígenos somáticos de outros parasitos frequentes na mesma área, com o objetivo de remover os anticorpos reativos a antígenos comuns. Assim, para definição das concentrações ótimas de antígenos de cada parasito (*Ancylostoma caninum*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Dipylidium caninum*), realizou-se uma curva com

absorção de soros em concentrações proteicas seriadas de 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL, 8mg/mL. Foram também realizadas duas absorções com 4mg totalizando 8mg/ml, porém fracionadas para todos os antígenos produzidos (Figura 5). Dessa forma, visando elevar a especificidade do teste ELISA na detecção de IgG anti-*T. canis*, 20 amostras de soros de cães positivos em co-infecções foram tratadas com absorções individuais em antígenos de *A. caninum*, *D. caninum* e *A. lumbricoides*. Todos os grupos formados através do pareamento dos resultados de amostras, com e sem absorção, apresentaram resultados estatisticamente significantes ($P < 0,0001$) para todos os antígenos, segundo análise pelo teste *T de student* (figura 6).

Foi avaliada a reatividade cruzada com absorções simultâneas em dois antígenos, sendo (1) primeira absorção com antígenos de *Ascaris* seguida de absorção com os demais antígenos; ou (2) absorção em coquetel com todos os antígenos. As análises dos grupos sempre pareados com as amostras sem absorção apresentaram resultados estatisticamente significantes, uma vez que as densidades ópticas obtidas decresceram em mais de 50% (Figura 7). Dessa forma, verificamos que a concentração ideal para absorção dos soros em antígeno das principais helmintíases de cães foi de 4mg/ml de cada antígeno no coquetel preparado. Através do pareamento entre amostras absorvidas com *Ascaris* (considerado “padrão ouro” para absorção dos soros humanos) e as demais absorções realizadas com mais de um antígeno no experimento, apresentaram resultados estatisticamente significantes, exceto para o pareamento realizado entre amostras absorvidas com *Ascaris* e amostras absorvidas consecutivas com *Ascaris* e *Dipylidium* (Abs: A-D) cujo valor de P encontrado foi 0,2511.

A absorção de soros em antígenos antes de submeter ao método ELISA é uma medida que tem sido empregada rotineiramente em vários estudos para aumentar a especificidade dos ensaios padronizados. Em humanos, já se tem definido que ao absorver soros em antígenos de *Ascaris suum* ou *Ascaris lumbricoides*, remove-se todos os anticorpos anti-*Ascaris* que porventura possam compartilhar epítomos específicos para IgG anti-*T. canis* (LYNCH et. al., 1988). No presente estudo, a reatividade cruzada entre *Ascaris lumbricoides* e *T. canis* mostrou-se significativamente reduzida após a etapa de absorção. Segundo Mendonça e colaboradores (2012), após absorção as densidades ópticas em soros humanos podem diminuir até 76,39%, evitando assim a

reação cruzada e aumentando a especificidade do teste. Bandas antigênicas com peso molecular de 55 a 66kDa avaliadas pela técnica de *Western Blotting*, são referidas como sendo responsáveis pela reatividade cruzada entre *A. lumbricoides* e *T. canis* e que desaparecem após absorção (NUNES et al., 1998). Bandas de 24 a 35kDa são relatadas como sendo altamente específicas para infecção por *T. canis* (ESPINOZA, 2008). Até o presente, não foram descritos na literatura ensaios padronizados e definidos para o diagnóstico sorológico de toxocaríase em cães que incluam análise de reatividade com outros parasitos. A Figura 4 ilustra esquematicamente a padronização do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), como o descrito por De Savigny (1975) com antígeno E/S *T. canis*, que serviu de base para outros autores que também padronizaram ensaios (PALUDO et al., 2007; REGIS et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012).

Figura 5: Padronização da absorção de soros com antígenos de *Ascaris lumbricoides*, *Dipylidium caninum*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma caninum* em concentrações de 2mg, 4mg, 6mg, 8mg e 2x 4mg/mL em ensaio imunoenzimático indireto para detecção de IgG anti-*T.canis*.

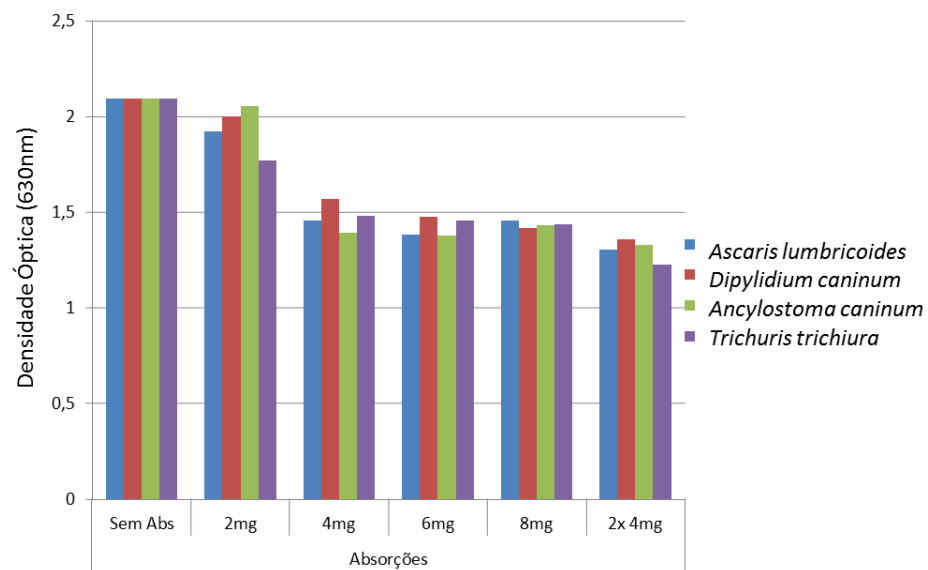


Figura 6: Reatividade de IgG anti-*Toxocara canis* em soros de cães por Elisa indireto usando como antígeno TcES larval, após absorções individuais dos soros com antígenos somáticos de *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum*.

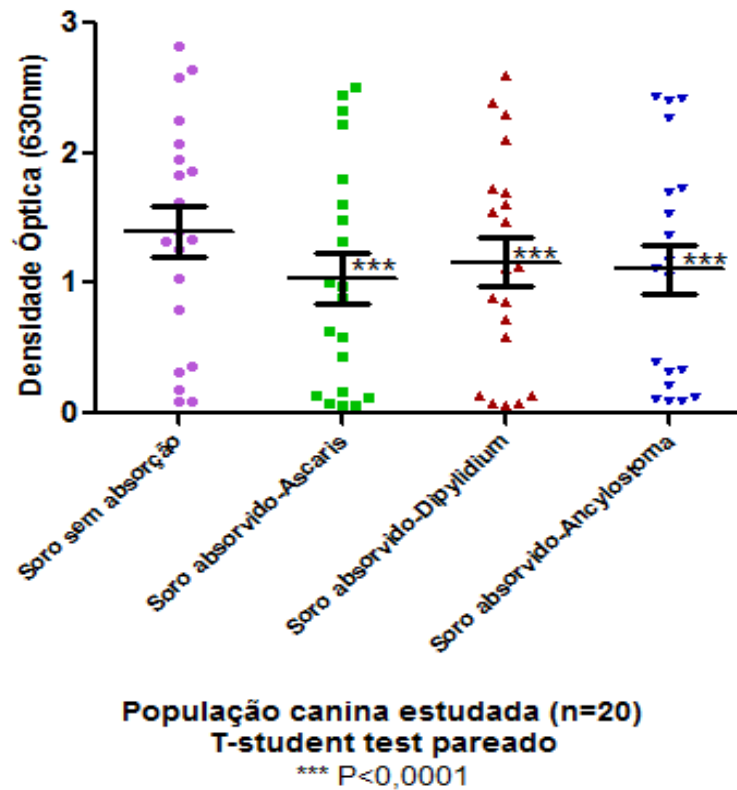
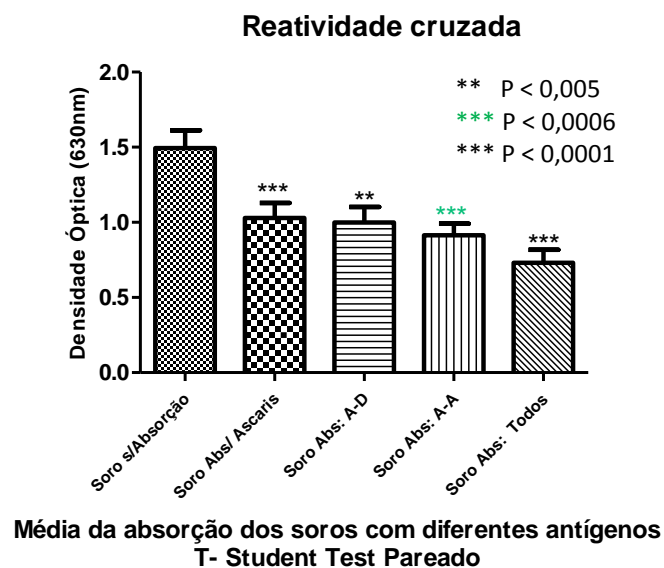


Figura 7: Reatividade de IgG anti-*Toxocara canis* em soros de cães por Elisa indireto usando como antígeno TcES larval, após absorções dos soros com antígenos somáticos de *Ascaris lumbricoides*, duplas absorções (1ª em *Ascaris lumbricoides* e 2ª em *Ancylostoma caninum* ou *Dipylidium caninum*) e absorção tripla (todos os antígenos).

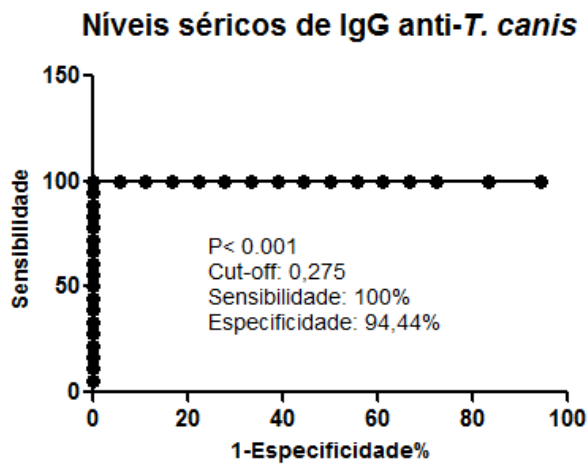


A caracterização das proteínas antigênicas e associadas a reações cruzadas pode também ser realizada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida seguida da realização de *Western Blotting*. Até 15 bandas de proteínas já foram detectadas em TES-Ag, por géis de SDS- PAGE, sendo as mais abundantes de 32, 55, 70 120, e 400 kDa (PAGE et al., 1992). Na literatura, padrões de bandas de baixo peso molecular (24, 28, 30 e 35kDa tem sido considerados específicos, não reagindo cruzadamente com antígenos de outros helmintos (MAGNAVAL et al., 1991). Os antígenos com 200, 147 e 132kDa são referidos como de padrões de alto peso molecular e principais responsáveis pela reatividade cruzada entre antígenos de helmintos, tais como os já confirmados em humanos com *Strongyloides sp.*, *Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*, *Toxascaris leonina*, *Schistosoma sp.*, *Onchocerca sp* (RADMAN et al., 2000; MAGNAVAL et al., 1991; CUELLAR et al., 1995; DEKUMYOY et al., 2000), *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura* e *Enterobius vermiculares* (LYNCH et al., 1988). Em áreas endêmicas, com elevadas prevalências de parasitoses, a incubação prévia em antígenos, principalmente de *Ascaris*, tem sido sugerida por alguns autores como solução para aumentar a especificidade dos testes (LYNCH et al., 1988).

A sensibilidade e a especificidade do teste ELISA indireto para sorodiagnóstico de toxocaríase canina em nesse estudo foram determinadas através da seleção de 18 amostras positivas e 18 amostras negativas para definição de coordenadas da curva ROC e seleção do ponto de corte (*cut-off*) (figura 8). De acordo o com valor de leitura de DO de 0,275, definido com ponto de corte estabelecido na detecção de IgG sérica anti-*T. canis* no ELISA indireto com TcES, a sensibilidade e especificidade foram calculadas em 100% e 94,44%, respectivamente. Como a padronização do presente teste para cães é inédita, não há na literatura resultados comparáveis de sensibilidade e especificidade em testes ELISAs semelhantes para a espécie canina. Contudo, através da técnica de Hemaglutinação indireta (IHAT) com antígeno somático a partir de ovos, parasito adulto e antígeno E/S larval de *Toxocara*, conferiram ao teste avaliado sensibilidade de 64.5%, 86.3% e 93.5%, respectivamente, e especificidade de 84.4%, 93.8% e 100%, respectivamente, na determinação da concentração de anticorpos anti-*T.canis* em 65 soros caninos (AWAD, et al., 2007). Para o diagnóstico de toxocaríase humana na prática clínica laboratorial, o teste ELISA com Ag E/S é referido como a técnica mais sensível e específica no imunodiagnóstico e em inquéritos

soroepidemiológicos, além de permitir detecção de IgG específicas no soro, fluidos oculares e liquor (SANTAREM et al., 2009). Glickman e colaboradores (1978) observaram em seus estudos que o teste ELISA apresentou 78,3% e 92,3% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Outros autores afirmam que a sensibilidade dessa técnica difere de acordo com o grau de infecção, variando de 80 a 95% e a especificidade de 90 a 95% (DESPOMIER, 2003; SMITH et al., 2009).

Figura 8: Curva ROC obtida na padronização da técnica de ELISA indireto com antígeno E/S larval para detecção de IgG anti-*T. canis* em soros de cães.

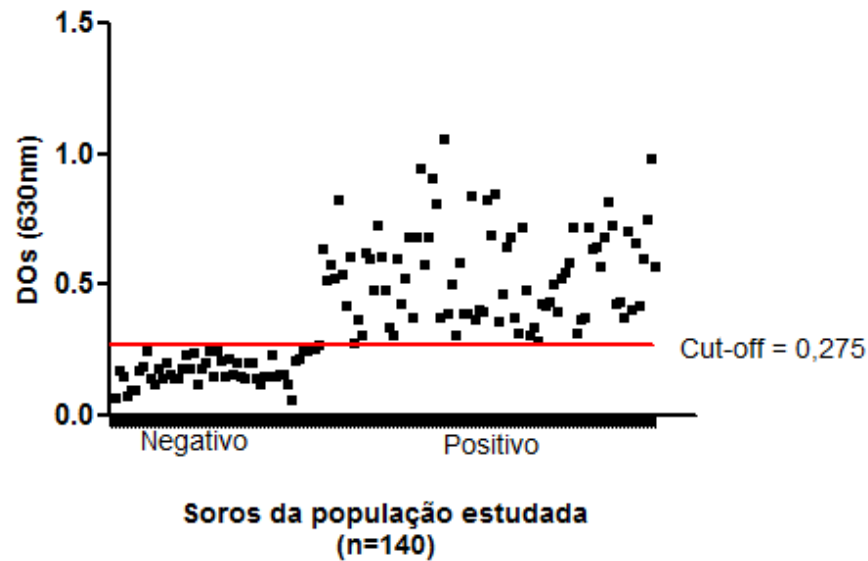


Atualmente, o diagnóstico de toxocaríase em medicina veterinária é realizado por meio de exames coproparasitológicos para detecção de ovos ou parasitos adultos. Os exames sorológicos, tais como o ELISA padronizado no presente estudo, vêm complementar e maximizar a sensibilidade diagnóstica por utilizar a detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara*. A grande limitação dos ensaios sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas, principalmente em áreas endêmicas e em cães que apresentam co-infecções. Convém ressaltar que embora o sorodiagnóstico seja uma ferramenta útil no diagnóstico dessas enfermidades, a interpretação dos seus resultados deve levar em consideração suas limitações. Como exemplo, a detecção de IgG não permite diferenciar uma infecção crônica de uma aguda ou exposição prévia, pois os níveis séricos dessa imunoglobulina persistem por longos períodos (MAIZELS et al., 1993).

No presente estudo, confirmada a reatividade cruzada, submetemos as 140 amostras de cães expostos a parasitoses à etapa de absorção por antígenos somáticos de outros parasitos antes da determinação da soroprevalência de toxocaríase canina por ELISA. Ressaltamos que a frequência parasitária obtida por exames fecais desses cães foi de 5%, sendo 1,43% (2/140) de infecções apenas por *T. canis* e 11,43% (5/43) de infecções mistas. Entretanto, a soroprevalência de toxocaríase canina utilizando o método ELISA foi de 61,4% (86/140), no ensaio padronizado com o ponto de corte determinado em 0,275. A distribuição de todas as amostras pode ser verificada na Figura 9.

Em publicações referentes à medicina veterinária, dois estudos destacam-se por terem sido realizados com soros caninos. O estudo pioneiro a detectar anticorpos anti-*Toxocara* em cães foi realizado no México, onde 141 soros caninos de diferentes regiões foram avaliados pela técnica de hemaglutinação indireta. Animais com títulos superiores a 1:32 foram considerados como possíveis portadores de infecção por *T. canis* e a soroprevalência determinada em 66,7% (MARTINEZ-BARBOSA et al., 2008). Apesar dos resultados de soroprevalência encontrados por esses autores terem sido semelhantes aos descrito no presente trabalho, seus ensaios foram realizados com antígeno à base de extrato bruto de vermes adultos de *T. canis*. O segundo e mais recente estudo realizado com amostras de cães foi o de Regis e colaboradores (2011), que padronizaram o primeiro ensaio ELISA indireto em cães que determinou soroprevalência de 82,7% em Salvador, Bahia. No estudo, os soros caninos foram absorvidos em 9 mg/mL de extrato somático de apenas um parasito, o *Ancylostoma caninum*.

Figura 9: Prevalência de IgG anti-*T. canis* em 140 amostras de soros caninos usando como antígeno E/S de *T. canis* em teste de ELISA indireto após absorção dos soros com antígenos somáticos de *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum*.



A distribuição dos resultados sorológicos com as variáveis sexo e idade revelou que 29,3% (41/140) correspondiam a animais machos e 70,7% (99/140) de fêmeas enquanto que 60,71% (85/140) correspondiam à faixa etária de 0 até 5 anos e que 39,29% (55/140) dos cães apresentava idade estimada superior a 5 anos. Associações positivas entre soropositividade para *Toxocara canis* e as variáveis sexo e idade foram encontradas com significância estatística pela análise univariada em fêmeas com soropositividade de 67,7%, OR- 2,42, IC- 95% (1.15-5.10) e animais com faixa etária, menor que 5 anos, cuja, soropositividade foi 74,5%, OR - 2,60, IC 95% que variou de 1.24 a 5.46 (Tabela 1). Fatores associados à infecção natural de cães e gatos são estudados por vários pesquisadores, tais como raça, sexo, idade do animal, uso de anti-helmínticos, condição social do proprietário, acesso à rua, alimentação, higiene do ambiente, renda familiar, nível de escolaridade dos proprietários, faixa etária do proprietário a fim de identificá-los e melhor compreender suas influências na frequência da infecção parasitária (BALASSIANO, 2007).

Tabela 1: Análise univariada da associação entre gênero e idade com soroprevalência de IgG anti-*T. canis* por ELISA em uma população canina em risco de infecção enteroparasitária, Salvador, Brasil, 2015.

Variáveis (n= 140)	IgG anti- <i>T. canis</i> (N= 91; 61,4%)			
	N (%)	N	OR (IC=95%)	Valor de P
Gênero				
Macho	19 (46,3)	41	1	
Fêmea	67 (67,7)	99	2.42 (1.15- 5.10)	0,018
Idade				
> 5 anos	45 (52,9)	85	1	
< 5 anos	41 (74,5)	55	2.60 (1.24 –5.46)	0.013

Observamos, no presente estudo, que idade abaixo de 5 anos e sexo feminino constituíram, fator de risco à infecção por toxocaríase. Regis et al. (2011) realizaram análise univariada entre as variáveis raça e idade, não encontrando resultados estatisticamente significantes apesar dos cães adultos terem sido mais infectados. Entretanto quanto ao sexo houve associação estatística significativa, sendo os machos mais infectados. Biologicamente, fêmeas podem apresentar maior soropositividade devido à interação entre fenômenos gestacionais e a ativação de larvas dormente de *T. canis*. Em filhotes, os aspectos de imaturidade imunológica natural e a possibilidade de nascerem já parasitados explicariam nossos achados de associação estatística.

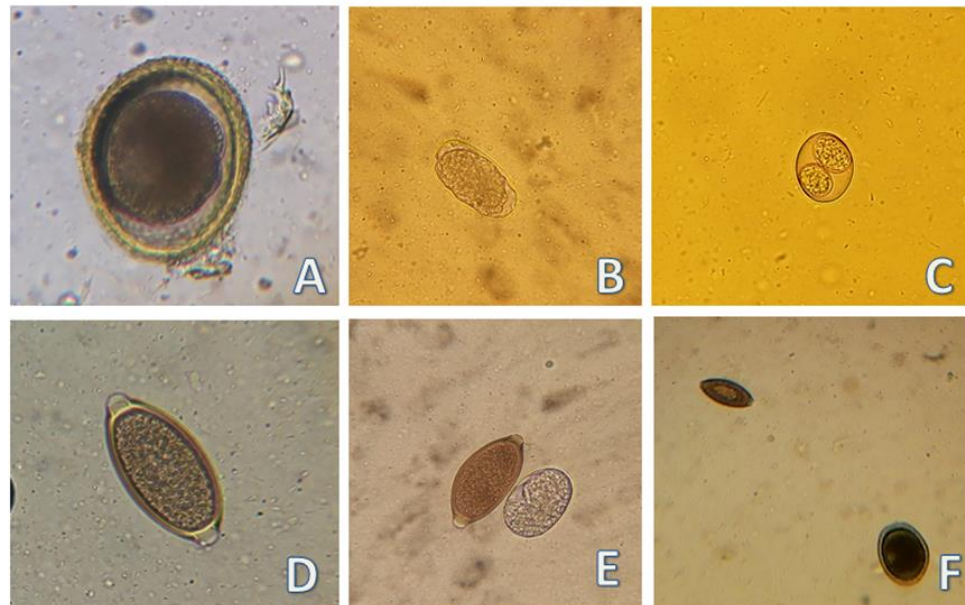
Dos 140 animais avaliados, 35 (25%) apresentaram-se saudáveis ao exame físico e 105 (75%) apresentavam um ou mais alterações clínicas. Das manifestações clínicas apresentadas pelos animais, destacaram-se mucosas hipocoradas, linfonodos reativos, sensibilidade abdominal, secreção ocular, alterações tegumentares e tempo de preenchimento capilar aumentado. À análise parasitológica, apresentaram-se positivos a quaisquer parasitos 70,71% (99/140) das amostras fecais, sendo 40,01% (56/140) de infecções confirmadas por apenas 1 (um) parasito, enquanto 30,71% (43/140) das

amostras apresentaram infecções mistas ou co-infecções entre dois ou três parasitos distintos. Em contraposição, 41 amostras foram negativas, correspondendo 29,29% (Tabela 2). Esses dados revelam que profissionais dos abrigos estão expostos, assim como a população humana como um todo, pois referem-se a animais resgatados em ambientes urbanos, onde deixam focos de infecções ao defecar em áreas comuns ao lazer público.

No presente estudo, foram encontrados helmintos pertencentes a três gêneros, *Ancylostoma*, *Toxocara* e *Trichuris* e um protozoário, o *Cystoisospora* (Figura 10). Uma alta frequência de infecções individuais por *Trichuris sp* foi observada, havendo 40 amostras positivas (28,57%); a segunda infecção mais frequente foi por Ancilostomídeos (9,29%; 13/140). Apenas dois cães foram positivos unicamente para *T. canis* (1,43%). Quanto aos protozoários, *Cystoisospora* foi encontrado em apenas uma amostra, representando 0,7% do total (Tabela 2). Embora tenha sido diagnosticada uma maior prevalência de infecções parasitárias individuais, infecções mistas também apresentaram altas frequências. Das 43 amostras positivas em co-infecções, 74,41% corresponderam a infecções por Ancilostomídeos com *Trichuris sp* (32/43), além de infecções triplas como: Ancilostomídeos com *T. canis* e *Trichuris sp*, 9,3% (4/43) e Ancilostomídeos com *Trichuris sp* e oocistos de *Cystoisospora* com 2,33% (1/43). Outras infecções mistas também puderam ser confirmadas e estão listadas na Tabela 3. Dados semelhantes foram encontrados em outros estudos, a exemplo do de Melo & Lebre (2011), que descreve fatores de risco associados a infecções parasitárias em três cães de Portugal. O estudo ainda demonstrou que protozoários do trato gastrointestinal (*Cystoisospora*, *Giardia* e *Cryptosporidium*) constituíram o grupo mais prevalente de parasitos, associados à existência de altas frequências de helmintíases zoonóticas, tais como parasitos da família Ancylostomatidae, *T. canis* e *Dipylidium caninum*.

Resultados semelhantes foram observados em estudos de população canina, havendo maior frequência de *Ancylostoma*, *Toxocara* e *Trichuris* em regiões diversas (BRENER et al., 2005; FUNADA et al., 2007; MIRCEAN et al., 2010; RAMÍREZ-BARRIOS et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2006). Esses achados são significativos para a saúde pública, pois tais parasitos são causadores de doenças zoonóticas como a *larva migrans* cutânea, *larva migrans visceral* e *larva migrans ocular*.

Figura 10: Ovos e oocistos identificados em parasitológicos fecais de cães (A- Ovo de *T. canis*, B - Ovos de Ancilostomídeos C – Oocistos de *Cystoisospora* D- Ovo de *Trichuris sp*, E - Co-infecção de *Trichuris sp* com Ancilostomídeos e F - Co-infecção de *Trichuris sp* com *Toxocara canis*. (Aumento: A, C e D - 400x , B e E -100x e F - 40x).



Fonte: Arquivo Pessoal

Tabela 2: Frequência de infecções parasitárias individuais e mistas em 140 cães abrigados em instituição filantrópica de Salvador, Bahia, submetidos à avaliação coproparasitológica.

Parasitos	Total	%
Helmintos		
Ancilostomídeos	13	9,29
<i>Trichuris sp</i>	40	28,57
<i>Toxocara canis</i>	2	1,43
Protozoários		
Oocisto de <i>Cystoisospora</i>	1	0,71
Co-infecções	43	30,71
Negativos	41	29,29
Total	140	100

Tabela 3: Distribuição e Frequência de co-infecções parasitárias em cães abrigados em instituição filantrópica de Salvador, Bahia, submetidos à avaliação coproparasitológica.

Co-infecções parasitárias	Total	%
Ancilostomídeos e <i>Trichuris sp</i>	32	74,41
<i>Trichuris sp</i> + <i>Cystoisospora</i>	4	9,3
Ancilostomídeos + <i>Cystoisospora</i>	1	2,33
Ancilostomídeos + <i>T. canis</i>	1	2,33
Ancilostomídeos, <i>Trichuris sp</i> e <i>T. canis</i>	4	9,3
Ancilostomídeos, <i>Trichuris sp</i> e <i>Cystoisospora</i>	1	2,33
Total	43	100

Trichuris sp foi o parasito mais frequente no Abrigo São Francisco de Assis estudado no presente trabalho. A distribuição desse parasito é mundial, mas muitas vezes a infecção pode ocorrer sem diagnóstico. Contudo, o *Trichuris sp* representa problemas em criações com más condições higiênicas e na maioria dos abrigos, pois é bastante comum em animais errantes (BANOS et al., 1999). Merece destaque a enfermidade por seu potencial zoonótico, pois o homem, de forma acidental, infecta-se através da ingestão de terra ou água contaminada. Entretanto, o maior ou menor impacto desta zoonose depende diretamente do tratamento e prevenção da infecção em animais, além de medidas higiênicas e educacionais, como a remoção de fezes no ambiente, antes que se tornem fontes de infecção.

Rotineiramente, cães são abandonados em centros urbanos, muitos em estado precário de saúde, manifestando doenças infectocontagiosas. Frequentemente os donos desses animais não têm condições financeiras de arcar com custos de tratamento, ou simplesmente não tem interesse mais na companhia e benefícios que a guarda de um animal pode proporcionar. O fato de animais portadores de infecções zoonóticas, tais como toxocaríase, serem abandonados em centros urbanos, acaba por elevar os índices de prevalência e incidência dessas parasitoses tanto em animais como humanos, trazendo riscos à população como um todo.

Ao correlacionar os resultados sorológicos com resultados parasitológicos em exames fecais de cães, notou-se que animais com infecções ativas por *T. canis* apresentaram maior reatividade de anticorpos, apresentando densidades ópticas entre 1,000 e 1,500.

No presente estudo, densidades ópticas semelhantes foram encontradas em animais portadores de outras infecções parasitárias, caracterizando assim a possibilidade de infecção ativa (Tabela 4). Animais em estágio subclínico, sem apresentar eliminação de ovos nas fezes, mas com larvas em estágio de hipobiose podem explicar essa faixa de altos valores de leitura de DO no ELISA, o que indicaria, portanto, infecção latente.

Tabela 4: Distribuição e correlação da soropositividade canina para toxocaríase em intervalos de densidades ópticas por grupos específicos obtidos com exames coproparasitológicos.

Infecções Parasitárias	IgG - Elisa toxocaríase				Nº de soros testados
	Distribuição das densidades Ópticas				
	0 - 0,275	0,275 - 0,500	0,500 - 1,00	1,00 - 1,500	
Ancilostomídeos	3	4	6	0	13
<i>Trichuris spp</i>	19	12	7	2	40
<i>Toxocara canis</i>	0	0	0	2	2
Oocisto de <i>Cystoisospora</i>	0	0	1	0	1
Ancilostomídeos e <i>Trichuris spp</i>	10	5	10	7	32
<i>Trichuris spp</i> + <i>Cystoisospora</i>	4	0	0	0	4
Ancilostomídeos + <i>Cystoisospora</i>	0	1	0	0	1
Ancilostomídeos + <i>T. canis</i>	0	0	0	1	1
Ancilostomídeos, <i>Trichuris spp</i> e <i>T. canis</i>	0	0	3	1	4
Ancilostomídeos, <i>Trichuris spp</i> e <i>Cystoisospora</i>	0	0	1	0	1
Negativos	18	12	10	1	41
Total	54	34	38	14	140

Abrigos filantrópicos deveriam servir como lares temporários para cães e gatos errantes, e alguns desses animais chegam a ser adotados em feiras promovidas em eventos, mas como a maioria dos animais nessas instituições são senis, esses lares tornam-se permanentes.

Além de comprometer a saúde da população por defecar em áreas urbanas em que circulam outros cães e pessoas, animais doentes abandonados constituem reservatórios de agentes infecciosos para pessoas responsáveis pelo manuseio de cães abrigados em canis (funcionários, voluntários, veterinários, visitantes). Esses agentes incluem *Ancylostoma caninum*, *T. canis*, *Giardia sp.* e *Cryptosporidium sp.*, parasitos

frequentemente diagnosticados. Medidas simples tais como vermifugação e medidas higiênicas minimizariam o risco de exposição da população humana e de animais de estimação e conseqüentemente promoveria a saúde pública (MELO & LEBRE, 2011).

A soroprevalência da infecção por *T. canis* em cães no presente estudo mostrou-se elevada quando comparada com aquelas encontradas em estudos de prevalência parasitária em exames coproparasitológicos caninos como os achados da Alemanha (22,4%) (BARUTZKI E SCHAPER, 2003), Austrália (38%) de (BLAKE E OVEREND, 1982), Itália (33,6%) (HABLUETZEL et al., 2003), Japão (4,3%) (ITOH et al., 2004), Estados Unidos (3,1%) (HACKETTLAPPIN, 2003) e na América Latina (53%) (SCHANTZ, 1989). A alta soropositividade encontrada nos cães do presente estudo, embora tenha sido encontrada em animais em condições favoráveis à aquisição e desenvolvimento da infecção, indica que estudos de soroprevalência devem ser realizados de forma mais abrangente para que medidas de controle sejam estabelecidas na cidade.

O método ELISA aqui desenvolvido representa uma contribuição à demanda por novos métodos de diagnóstico, capazes de diagnosticar animais portadores de infecções subclínicas, animais que apresentem exames coprológicos falsamente negativos e cadelas prenhes que possam apresentar o parasito em estágio de hipobiose ou infectar filhotes pelas vias transmamária e transplacentária. Tais animais podem, no âmbito ambulatorial, ser tratados para impedir que tornem-se fontes de infecção e contaminação ambiental. Portanto, os exames sorológicos devem ser empregados para complementar o diagnóstico parasitário canino e principalmente auxiliar na elaboração de medidas profiláticas.

7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu a contribuição com dados sobre um tema de fundamental importância: a toxocaríase canina e demais parasitoses gastrointestinais de cães. Além dos dados, foi padronizado e validado um método sorológico capaz de discernir cães infectados de cães negativos.

A realização do imunodiagnóstico indireto em cães, por detecção de anticorpos anti-*T. canis* em soros mostrou-se possível. Foi padronizado o ensaio imunoenzimático indireto, a partir de soros controles positivos e negativos. Contudo, para aumentar a especificidade do deste teste, e uma vez que infecções mistas em caninos são muito comuns, demonstramos ser necessário que os soros a serem testados nos ensaios, passem por um procedimento de absorção, com remoção de anticorpos de outros helmintos que possam reagir cruzadamente. A reatividade cruzada neste estudo foi confirmada através da análise em ELISA indireto para toxocaríase com amostras sem e com absorção, pois após absorção as densidades ópticas reduziram em mais de 50%. Outros parasitos frequentes em cães devem ser avaliados, para investigar novas reatividades cruzadas, bem como testes com soros de animais com e sem absorção no Western Blotting. Assim, bandas comuns entre os parasitos poderão ser avaliadas.

A soroprevalência para toxocaríase canina obtida, quando comparada com resultados parasitológicos fecais, mostrou que um grande percentual de cães pode constituir potencial de risco a infecção por disseminar focos de infecção em toda cidade, visto que cães abrigados na instituição avaliada foram resgatados em pontos diferentes da cidade Salvador/Bahia.

Com o estreitamento, cada vez maior, da relação homem-animal, torna-se fundamental a adoção de medidas eficazes que visem o controle e prevenção de doenças infecciosas, entre as quais incluem-se as causadas por enteroparasitos caninos. Conseqüentemente foi possível contribuir com um produto, o ELISA padronizado, e com dados para o meio científico e dessa forma, para a minimização dos riscos à saúde pública.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Imunologia celular & molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 486P. cap. 4, 2005.

AJAYI O.O, DUNHLINSKA D.D, AGWALE S.M, NJOKU M. Frequency of human Toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 147-149, 2000

ABE. N.; YASUKAWA, A. Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in sandpits of parks in Osaka city, Japan, with notes on the prevention of egg contamination by fence construction. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 59, n. 1, p.79-80, 1997

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

ALCÂNTARA-NEVES, N.M.; de S. G. BRITTO, G., VEIGA, R.V.; FIGUEIREDO, C.A.; FIACCONE, R.L.; da CONCEIÇÃO, J.S.; CRUZ, Á.A.; RODRIGUES, L.C. COOPER, P.J.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; BARRETO, M.L. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC Research Notes*. v. 19, n. 7, p. 817,2014

ANDRADE, E. C.; LEITE, I. C. G.; RODRIGUES, V. O.; CESCO, M. G. Parasitoses intestinais; Uma revisão sobre seus aspectos sociais e, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos, *Revista de APS*, Juiz de Fora, v. 13, n. 2, p. 231-240, abr./jun. 2010.

ALONSO, J.M.; BOJANICH, M.V.; CHAMORRO, M.; GORODNERO, J.O. *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo*, v. 42, p. 235-7, 2000.

ARAÚJO, F. R.; CROCCI, A. J.; RODRIGUES, R. G. C.; AVALHAES, J. S.; MIYOSHI, M. I.; SALGADO, F. P.; SILVA, M. A.; PEREIRA, M. L. Contaminação de praças públicas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, por ovos de *Toxocara* e *Ancylostoma* em fezes de cães. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n.5 p. 581-583, set-out, 1999.

AWARD, A. H. H.; AL- AZZIZ, A. A. A. Immunological study of *Toxocara canis* in dogs and mice at basrah city. **QMJ**, v. 3, n. 4, Dec. 2007.

AYDENIZO “Z-0” ZKAYHAN, M.; YAG, B.B; ERAT, S. The investigation of *Toxocara canis* eggs in coats of different dog breeds as a potential transmission route in human toxocariasis. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 94–100, 2008.

BALASSIANO, B. C. C. **Fatores associados à infecção natural de cães por parasitos gastrintestinais**, 2007. 61f. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

BANOS, P.D., BANOS, N.D. & MORRONDO PELAYO, M.P. Nematodosis: oxocariosis, Toxascariosis, Ancilostomosis, Tricuriosis, Estrongiloidosis, Espirocercosis, Olulanosis. In Cordero del Campillo **Parasitologia Veterinaria**, p. 636-651, 1999.

BARUTZKI, D.; SCHAPER, R.,. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999–2002. **Parasitology Research**. v. 3, p.148–150, 2003.

BARRIGA , OO. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. **Veterinary Parasitology**. v. 29, p. 195-234, 1988.

BEAVER, P.C. Parasitological Review-Larva Migrans. **Experimenatal Parasitology**, v. 5, p. 587, 1956.

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

BEAVER, P.C. et al. Chronic eosinophillia due to visceral larva migrans: report of three cases. **Pediatrics**, v. 9, n. 1, 1972.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1497-1507, 1999.

BLAKE, R.T.; OVEREND, J. The prevalence of *Dirofilaria immitis* and other parasites in urban dogs in north-eastern Victoria. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 111–114, 1982.

BRENER, B.; LISBOA, L.; MATTOS, D. P. B. G.; ARASHIRO, E. K. N.; MILLAR, P. R.; SUDRÉ, A.P.; DUQUE, V. Frequência de enteroparasitas em amostras fecais de cães e gatos dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 102-105, jan./dez. 2005.

BUTTERWORTH, A. E. Immunological aspects of human schistosomiasis. **British Medical Bulletin**, v. 54, p. 357-68, 1998

BWALYA, E.C.; NALUBAMBA, K. S.; HANKANGA, C.; NAMANGALA, B. Prevalence of canine gastrointestinal helminths in urban Lusaka and rural Katete Districts of Zambia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 100, p. 252– 255, 2011.

CAMPOS FILHO, P. C.; BARROS, L. M.; CAMPOS, J. O.; BRAGA, V. B.; CAZORLA, I. M.; ALBUQUERQUE, G. R.; CARVALHO, S. M. S. Parasitas zoonóticos em fezes de cães em praças públicas do município de Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n 4, p. 206-209, 2008.

CAPUANO, D. M.; ROCHA, G.M. Ocorrência de parasitas com potencial zoonótico em fezes de cães coletadas em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.9, n.1, p. 81-86, 2006.

CHIEFFI, P.P.; MULLER, E.E. Prevalência de parasitismo por *Toxocara canis* em cães e presença de ovos de *Toxocara sp.* no solo de localidades públicas da zona urbana do município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Ver. Saúde Pública**, S. Paulo, v. 10, p. 367-72, 1976.

CHIEFFI, P. et al. Recovering of *Toxocara canis* eggs from samples of experimentally contaminated soil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 50, n. 6, p. 361-362, 2008.

CHIODO, P.; BASUALDO, J.; CIARMELA, L.; PEZZANI, B.; APEZTEGUÍA, M.; MINVIELLE, M. Related factors to human toxocariasis in rural community of Argentina. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 397-400, 2006.

CHOMEL, B. B. Control and prevention of emerging parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1211–1217, 2008.

CILLA G, PERES-TRALLERO E, GUTIERREZ C, PART C, GOMARIZ M. Seroprevalence of *Toxocara* infection in middle-class and disadvantaged children in northern Spain (Gipuzkoa, Basque Country). *European Journal of Epidemiology*, v. 12, p. 541-543, 1996.

CUELLAR, C.; FENOY, S.; GUILLEN, J. L. Cross-reactions of sera from *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* infected mice with *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens. *International journal for parasitology*. v. 25(6) p.731-9, 1995.

DATTOLI, V. C. C.; FREIRE, S. M.; MENDONÇA, L. R.; SANTOS, P. C.; MEYER, R.; ALCANTARA-NEVES, N. M. *Toxocara canis* infection is associated with eosinophilia and total IgE in blood donors from a large Brazilian centre. *TM & IH. Tropical medicine and international health (Print)* ^{JCR}, v. 16, p. 514-517, 2011.

DE BRITO, T.; CHIEFFI, P. P.; PERES, B. A.; SANTOS R. T.; GAYOTTO, L. C. C.; REGINA VIANA, M. Immunohistochemical detection of toxocaral antigens in humans biopsies. *International Journal of Surgical Pathology*, v. 2, p. 117-124, 1994.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clinical Microbiology Reviews*. v. . 16, n. 2, p. 265-272, 2003.

de SAVIGNY, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larval and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in seroepidemiological test for visceral larva migrans. *Journal Parasitology*, v. 61, p. 781-784, 1975

de SAVIGNY, D.H.; VOLLER, A.; WOODRUFF, A.W. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal Clinical Pathology*, v. 32, p. 284-288, 1979

DEKUMYOY, P.; KOMALAMISRA, C.; NUAMTANONG, S.; NACAPUNCHAI, D.; SINNAWONG, M.; SHANAHA, P.; PIYASATITTAM, P. Angiostrongyliasis: analysis of antigens of *Angiostrongylus costaricensis* adult worms versus IgG from infected patients with *Angiostrongylus cantonensis*. *Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand*. v. 31, p. 48-53, 2000.

DUBEY JP, Patent *Toxocara canis* infection in ascarid-naive dogs. **Journal of Parasitology**, v. 64, p. 1021-1023, 1978.

DUBNÁ, S.; LANGROVÁ, I.; NÁPRAVÍNK, J.; JANKOVSKÁ, I.; VADLEJCH, J.; PEKÁR, S.; FECHTNER, J. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 120–128, 2007.

DUMENIGO, B. E GALCEZ, D. Soil contamination in ciudad de la Habana province with *Toxocara canis* eggs. **Revista Cubana de Medicina Tropical** v. 47, p. 178-180, 1995

ELSE, K. J.; FINKELMAN, F. D. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.8, p. 1145-58, 1998

ESPINOZA, Y. et al. Clinical and serological evidence of *Toxocara* infection in school children from Morrope District, Lambayeque, Peru. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 101-105, 2008.

FAN, C.K.; LIAO, C.W.; KAO, T.C.; LI, M.H.; DO, W.Y.; SU, K.E. Sero-epidemiology of *Toxocara canis* infection among aboriginal schoolchildren in the mountainous areas of north-eastern Taiwan. **Ann Tropical Medicine Parasitology**, v. 99, n. 6, p. 593-600, 2005.

FERRE, P.; DORCHIES Recherche des œufs de *Toxocara* dans le sable des aires de jeux de huit jardins publics de Toulouse **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 151, n. 6, p. 501-506, 2000.

FILLAUX, J. SANTILLAN, G.; MAGNAVAL, J. F.; JENSEN, O.; LARRIEU, E. BECARIA, D. S. Epidemiology of toxocariasis in a steppe environment: The Patagonia study. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 1144–1147, 2007.

FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C.A.; MORRIS, S. C.; MADDEN, K. B.; GAUSE W. C.; URBAN, J. F. Jr. Cytokine

regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annual Review of Immunology**, v.15, p. 505-33, 1997.

FONTANARROSA, M. F.; VEZZANI, D.; BASABE J.; EIRAS, D. F. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): Age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 283–295, 2006.

FRIEDMAN, R. D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 346-349, 1982

FUNADA, M. R.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; GENNARI, S. M. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1338-1340, 2007.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.36, n. 2, 1999.

GIACOMETTI A, CIRIONI O, FORTUNA M, OSIMANI P, ANTONICELLI L, DEL PRETE MS, RIVA A, D'ERRICO MM, PETRELLI E, SCALISE G. Environmental and serological evidence for the presence of toxocariasis in the urban area of Ancona, Italy. **European Journal of Epidemiology**, v. 16, p.1023-6, 2000.

GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ, P.M. Epidemiology and Pathogenesis of Zoonotic Toxocariasis. **Epidemiology Review**, v. 3, p.230-250, 1981.

GLICKMAN, L.T.; MAGNAVAL, J.F.; DOMANSKI, L.M.; SHOFER, F.S.; LAURIA, S.S.; GOTTSTEIN, B. et al. Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome? **American Journal Epidemiology**, v. 125, p. 1019-1034, 1987.

GLICKMAN, K.W.; GRIEVE, R.B.; SCHANTZ, P.M. Immunodiagnosis of parasitic diseases: Academic Press, N.Y.; 1986.

GLICKMAN, L.T. et al. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 27, p. 492-498, 1978.

GUIMARÃES, A.M.; ALVES, E.G.L.; REZENDE, G.F.; RODRIGUES, M.C. Ovos de *toxocara* sp. e larvas de *ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG . **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p.293-5, 2005.

GRZYCH, J.M.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.; CAULADA, Z. A.; CASPAR P.; HEINY, S.; LEWIS, F. SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **Journal of Immunology**, v.15;146(4) p.1322-7, 1991

HACKETT, T.; LAPPIN, M.R.; Prevalence of enteric pathogens in dogs of north-central Colorado. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, p. 52–56, 2003.

HATSCHBACH, P. História da Saúde Pública Veterinária e as suas relações com outras ciências biológicas. Disponível em: <http://www.ahoraveterinaria.com.br/historia.htm>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2014

HABLUETZEL, A.; TRALDI, G.; RUGGIERI, S.; ATTILI, A.R., SCUPPA, P.; MARCHETTI, R.; MENGHINI, G. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. **Veterinary Parasitology**, v.113, p. 243–252., 2003.

HENDRIX, C.M. *Diagnostic Veterinary Parasitology*. (2nd ed.). St. Louis: Mosby, 1998.

HOFFMANN, R. P. Diagnóstico de parasitismo veterinário. Porto Alegre: Sulina, 1987.

IDDAWELA, R.D.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; PERERA, N.A.N.D.; AGATSUMA, T. Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. **Korean Journal of Parasitology**, v. 45, p. 19-26, 2007.

ITOH, N.; MURAOKA, N.; AOKI, M.; HAGAKI, T. Prevalence of *Toxocara canis* infection in household dogs. **Kansenshogaku Zasshi**. v. 78, p. 114–119, 2004.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. O sistema imunológico na saúde e na doença. **Imunobiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul LTDA,2007.

JACQUIER P.; GOTTSTEIN B.; STINGELIN Y.; ECKERT J. Immuno-diagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1831–1835, 1991.

JUNIOR, D. C.; ELEFANT, G. R.; MELO e SILVA, E. O.; GANDOLFI, L.; ABE JACOB, C. M.; PRATESI, R. Frequência de soropositividade para antígenos de *Toxocara canis* em crianças de classes sociais diferentes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 36(4): 509-513, jul-ago, 2003.

KANAMURA, H.Y.; ARAÚJO, A.J.U.S.; KANASHIRO, E.H.Y. **Revista Biociência**, v. 9, p. 31-36, 2003

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.74, n.2, p.175-184, abr./jun., 2007.

KIMMIG P, NASER K, FRANK W. Seroepidemiologic studies of human toxocariasis. **Zentralbl Hyg.Umweltmed**, v. 191, p. 406-422, 1991.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. Immunology. Palgrave/W.H. Freeman, 2006.

LABRUNA, M. B.; PENA, H. F. J.; SOUZA, S. L. P.; PINTER, A.; SILVA, J. C. R.; RAGOZO, A. M. A.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de monte negro, Rondônia. **Aquivo de Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.183-193, abr./jun., 2006.

LESCANO, S.Z.; NAKHLE, M.C.; CHIEFFI, P.P. Efect of "in vitro" cultivation time on the infectivity of *toxocara canis* eggs. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 201-202, 1998.

LITTLE, S. E.; JOHNSON, E.M.; LEWIS, D.; JAKLITSCH R. P.; PAYTON, M. E.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; MOROFF, S.; TAMS, T.; RICH, L.; AUCOIN, D. Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p.144–152, 2009.

LOUKAS, A, PROVIC, P. Immune responses in Hookworm infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 689-703, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with Folen Phenol Reagent. **Journal of Chemical Biology**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUO ZJ, WANG GX, YANG CI, LUO CH, CHENG SW, LIAO L. Detection of circulating antigens and antibodies in *Toxocara canis* infection among children in Chengdu. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 252-256, 1999.

LYNCH, N.R.; WILKES, L.K.; HODGEN, A.N.; TURNER, K.J. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. **Parasite Immunology**, **10**: 323-37, 1988.

LYNCH NR, PALENQUE M, HAGEL I, DI PRISCO MC. 1997. Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in a tropical situation. **American Journal Respiratory Critic Care Medicine**, v.156, n.1, p.50-4, 1997

MACDONALD, A.; ARAUJO, M. I.; PEARCE, E. J. Immunology of parsitic helminth infection. **Infect Immun**. 70:427-33, 2002.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez. 2004

MAGNAVAL, J.F.; FABRE, R.; MAURIERES, P.; CHARLET, J.P.; DE LARRARD, B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariosis. **Parasitology research**. V.77(8), p.697-702, 1991.

MAGNAVAL, J.F.; FABRE, R.; MAURIÉRES, P.; CHARLET, J.P.; LARRARD, B. Evaluation of an Immunoenzymatic Assay Detecting Specific Anti-*Toxocara*

Immunoglobulin E for Diagnosis and Posttreatment Follow-up of Human Toxocariasis. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2269-2274, 1992.

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

MAIZELS, R. M.; BUNDY, D.A.; SELKIRK, M.E.; SMITH, D. F.; ANDERSON, R.M. Immunological modulations and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature**, v. 365, p. 797-805, 1993.

MAIZELS, R. M.; TETTEH, K. K.; LOUKAS, A. *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. **International Journal Parasitology** v. 30, n. 4, p. 495-508, 2000.

MAIZELS, R.M. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. **Veterinary Parasitology**, v.193, p. 365–374 367, 2013.

MARCHIORO, A. A.; COLLIZ, C. M.; PALUDO, M. L.; MELOS, G. C.; ADAMI, C. M.; PELLOSO, S. M.; GUILHERME, A. L. Avaliação eosinofílica e soropositividade para anticorpos IgG anti-*toxocara* em crianças atendidas pelo Sistema Único de Saúde.

MARCHIORO, A. A.; COLLI, M. C.; MATTIA, S.; PALUDO, M.L.; MELO, G. C.; ADAMI, C. M.; PELLOSO, S. M.; GUILHERME, A. L. F. Eosinophilic count and seropositivity for IgG antibodies to *toxocara spp.* in children assisted at the public health servisse. **Revista Paulista de Pediatria**, v.29, n.1, p. 80-4, 2011.

MARTÍNEZ-BARBABOSA, I.; QUIROZ, M. G.; GONZALEZ, L.A.; CARDENAS, E. M.G.; EDUBIEL, A. A.S.; JUAREZ, J. L. V.; GAONA, E. Prevalence of anti-*T. canis* antibodies in stray dogs in Mexico City. **Veterinary Parasitology**. v.153, p. 270–276, 2008.

MATOS, M. S.; LEITE, M. L. S.; PEDREIRA, E. D.; COSTA, A. A.; ELOY, E. E. estudos cronológico da frequência de ovos de helmintos gastrintestinais em fezes de cães. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA**, Salvador, 4:36-58,1979.

MEGHJI M.; MAIZELS R.M. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 18(2) p.155-70, 1986.

MELO, F. L.; LEBRE, C. R. rastreio de parasitas gastrintestinais e seu impacto zoonótico em cães de canil da cidade de Lisboa.LISBOA, 2011. 155 p. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 2011.

MENDES, C. R.; TEIXEIRA, A. T. L. S.; PEREIRA, R. A. T.; DIAS, L. C. S. Estudo comparativo de técnicas parasitológicas: Kato-Katz e coprotest. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 178-180, mar-abr, 2005.

MENDONCA, L. R.; VEIGA, R. V.; DATTOLI, V. C. C.; FIGUEIREDO, C. A.; FIACCONE, R. et al. (2012) *Toxocara* Seropositivity, Atopy and Wheezing in Children Living in Poor Neighbourhoods in Urban Latin American. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n.11, p. 1886, 2012.

MENDONÇA, L.R.; FIGUEIREDO, C.A.; ESQUIVEL, R.; FIACCONE, R.L.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; COOPER, P.; BARRETO, M.L.; ALCANTARA-NEVES, N.M. Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v.128, p. 90–95, 2013.

MINVIELLE, M.; TAUS, M.; RAFFO, M.; CIARMELA, M.; BASUALDO, J. Seroprevalence of toxocariasis in blood donors of Gualaguachú, Argentina. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 373-375, 2000.

MIRCEAN, V.; TITILINCU, A.; VASILE, C. Prevalence of endoparasites in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p.163–166, 2010.

MITREVA, M.; ZARLENGA, D.S.; MCCARTER, J. P.; JASMER, D.P. Parasitic nematodes—From genomes to control. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 31–42, 2007.

MOHAMAD, S.; AZMI, N.C.; NOORDIN, R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 6, p. 1712-7, 2009.

NEVA F. A.; BROWN H.W. Basic clinical parasitology. **Appleton & Lange**, p. 107-144, 1994.

NUNES, C.M.; TUNDISI, R.N.; HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; ORGASSAWARA, S.; RICHTZENHAIN, E.L. Imunização intra-esplênica de camundongo com antígeno excretor-secretor de *Toxocara canis* imobilizado em membrana de nitrocelulose. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 7, n.1, p. 21-25, 1998.

OGE, H. & OGE, S. - Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 75-79, 2000.

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

OSBURN, B.I. Emerging diseases with a worldwide impact and the consequences for veterinary curricula. **Veterinary Quarterly**, v.18, n.3, p.124-126, 1996

OVERGAAUW, P. A. M. Aspects of *Toxocara* Epidemiology: Humans Toxocariasis. **Critical review in Microbiology**, v 23, n.3, p. 215-231, 1997.

OVERGAAUW, P.A.M. & VAN KNAPEN, F. Toxocariosis, an important zoonosis. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 18 (3), p. 260-266, 2008.

OVERGAAUW, P.A.M.; ZUTPHEN, L.; HOEK, D.; YAYA, F.O.; ROELFSEMA, J.; PINELLI, E.; KNAPEN, F.; KORTBEEK, L.M. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 115–22, 2009.

PAGE AP, RUDIN W, FLURI E, BLAXTER ML, MAIZELS RM. *Toxocara canis*: a labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. **Experimental parasitology**. V.75(1) p.72-86, 1992.

PALMER, C. S.; THOMPSON, R. C. A.; TRAUB, R. J.; REES, R.; ROBERTSON, I. D. National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 181–190, 2008.

PALUDO, M. et al. Frequency of *Toxocara* infection in children attended by health public service of Maringá, South Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 49, n.6, p. 343-348, 2007.

PEIXOTO, P.L.; NASCIMENTO E.; CANÇADO, G.G.L.; MIRANDA, R.R.C.; ROCHA, R.L.; ARAÚJO, R.N. Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocarosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 106, p. 200-6, 2011.

QUEIROZ, M. et al. Frequency of soil contamination by *Toxocara canis* eggs in the south region of São Paulo municipality (SP, Brazil) in a 18-month period. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 317-319, 2006.

RADMAN, N. E.; RADMAN, N. E.; ARCHELLI, S.M.; FONROUGE, R. D.; DEL V GUARDIS, M.; LINZITTO, O. R. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the City of La Plata. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 281-285, 2000.

RAMÍREZ-BARRIOS, R. A.; BARBOZA-MENA, G.; MUÑOZ, J.; ANGULO-CUBILLÁN, F.; HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ, F.; ESCALONA, F. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 11–20, 2004.

REGIS, S.C.S.; MENDONCA, L. R.; SILVA, N. S.; DATTOLI, V. C. C.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; BARROUIN-MELO, S. M. Seroprevalence and risk factors for canine toxocarosis by detection of specific IgG as a marker of infection in dogs from Salvador, Brazi. **Acta Tropical**, v. 120, p. 46– 51, 2011.

ROBERTSON L.D.; IRWIN, P.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, p. 1369-1377, 2000.

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

RUBINSKY-ELEFANT, G.; SHIMIZU, S.H.; SANCHEZ, M.C.A.; JACOB, C.M.A.; FERREIRA, A.W. A Serological Follow-up of Toxocariasis Patients After Chemotherapy Based on the Detection of IgG, IgA, and IgE Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, p. 164–72, 2006

SALINAS, P.; REYES, L.; SOTOMAYOR M.T.; LETONJA, T. Prevalence de huevos de *Toxocara sp.* em algunas plazas públicas de la region metropolitana de Santiago, Chile. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.42, n.2, p 33-36, 1987.

SANTARÉM, V. A.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; CHESINE, P. A. F.; LELI, F. N. C. Toxocaríase canina e humana. **Veterinaria e zootecnia**, v. 16, n. 3, p. 437-447, 2009.

SANTOS, N. M.; SILVA, V. M. G.; THÉ, T. S.; SANTOS, A. B, SOUZA, T. P. Contaminação das praias por parasitos caninos de importância zoonótica na orla da parte alta da cidade de Salvador-BA. **Revista de Ciências Médicas Biológicas**, v. 5, p. 40-47, 2006.

SANTOS, L. P; SANTOS, F. L. P.; SOARES, N. M. Prevalência de parasitoses intestinais em pacientes atendidos no hospital universitário professor Edgar Santos, Salvador-Bahia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, p. 237-246, 2007

SANTOS, G. M.; ALMEIDA e SILVA, S.; BARBOSA, A. P.; CAMPOS, D. M. Investigação soropidemiológica sobre a larva migrans visceral por *Toxocara canis* em usuários de serviços de saúde de Goiânia – Go. Vol. 38 (3): 197-206. jul.-set. 2009.

SCAINI, C. J.; TOLEDO, R. N.; LOVATEL, R.; DIONELLO, M. A.; GATTI, F.A.; SUSIN, L.; SINORINI, V. R. M. Contaminação ambiental em fezes de cães na área

central do Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.36, n.5, p. 617-619,1999.

SCHANTZ, P.M.; GLICKMAN, L.T. Ascárides de perros y gatos: un problema de salud publica y de medicina veterinária. **Boletín de la oficina Sanitaria Panamericana**, v. 94, p. 571, 1983

SCHANTZ, P.M. *Toxocara* larva Migrans now. **American of Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.41, 21-34, 1989.

SCHANTZ, P.M. Parasitic zoonoses in perspective. **International Journal for Parasitology**, v. 21, n. 2, p.161-170, 1991.

SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M.; MAGNAVAL, J.F.; SCHANTZ, P.; MAIZELS, R. How common is human toxocariosis? Towards standardizing our knowledge. **Trends in parasitology**. v. 25(4), p. 182-8, 2009.

SPRENT, J.F.A. Visceral Larva Migrans. **Australian Journal Biological and Sciences**, v. 25, p.344, 1963.

SOUZA, R.F.; DATTOLI, V. C. C.; MENDONÇA, L. R.; JESUS, JOILSON R.; BAQUEIRO, T.; SANTANA,; SANTOS, N. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; ALCANTARA-NEVES, N.M. Prevalência e fatores de risco da infecção humana por *Toxocara canis* em Salvador, Estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 516-519, 2011.

SOUSA P. H. F.; MANHOSO F. F. R. Aspectos epidemiológicos da toxocaríase canina e sua repercussão na saúde pública. **UNIMAR CIÊNCIAS**, v. 17, p. 1-2, 2008.

SUDRÉ, A.P.; MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n.3, p.173-184, 2006.

TAIRA, K.; SAEED, I.; PERMIN, A.; KAPEL, C.M.O. Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. **Veterinary Parasitology**, v 121, p 115-124, 2004.

TONELLI E. Toxocaríase e asma: associação relevante. **Journal of Pediatrics (Rio J)**. 81:95-6, 2005

TORINA, A.; CARACAPPA, S.; BARRERA, A.; DIELI, F.; SIRECI, G.; GRENCI, C.; DEPLAZES, P.; SALERNO, A. *Toxocara canis* infection induces antigen-specific IL-10 and IFN γ production in pregnant dogs and their puppies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 247-251, 2005.

TORRICO, k. j.; SANTOS, K. R.; MARTINS, T.; PAZ E SILVA, F. M.; TAKAHIRA, R. K. LOPES, R. S. Ocorrência de parasitas gastrintestinais em cães e gatos na rotina do laboratório de enfermidades parasitárias da FMVZ/UNESP – Botucatu. SP. **Revista Brasileira de Parasitologia, Vet.**, v. 17, p. 182-183, 2008.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J., DUNCAN, J. L., DUNN, A. M., E JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2ª Ed.: p. 25-117, 1996.

VAN KNAPEN, F. et al. Visceral larva migrans: examination by means of enzyme-linked immunosorbent assay of human sera for antibodies to excretory-secretory antigen of the second stage larvae of *Toxocara canis*. **Z Parasitenkd Journal**, v. 63, p. 113-118, 1983.

VASCONCELLOS, M. C.; BARROS, J. S. L.; OLIVEIRA, C. S. Parasitas gastrointestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro, RJ. **Revista Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 40, n. 2, p. 321-323, 2006.

VERONESI, R. Tratado de Infectologia. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.1789-92.

VIANNA PAIM, G.; CAVALCANTE DE QUEIROZ, J. Uma definição para saúde pública veterinária. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.69, n.2, p.166-168, 1970.

MICHAEL. G.; WALSH, M.A.; HASEEB. Reduced cognitive function in children with toxocariasis in a nationally representative sample of the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 1159–1163, 2012.

WILLIS, H.H. A simple levitation method for detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, North Sidney, v.8, p.375-376, 1921.

WIWANITKIT, V.; WAENLOR, W. The frequency rate of *Toxocara* species contamination in soil samples from public yards in a urban area "Payathai", Bangkok, Thailand. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. Mar-Apr;46(2):113-4, 2004.

YBANEZ, M. R. .R.; GARIJO, M.M.; ALONSO, E. D. Prevalence and viability f eggs of *Toxocara spp*, and *Toxascaris leonina* in public parks in Eastern Spain. **Jounal of Helminthology**, v. 25, n 2-3, p. 169-173, 2001.

9. ANEXOS (ficha clínica, Gráfico de dosagem proteína).

Ficha Clínica/ Identificação: ___/___	
Dados do Animal: Nome _____ Idade _____ Peso _____ Raça _____ Pelagem _____	
Local de coleta: ABRIGO/CANIL () qual? _____ CCZ () Qual? _____	
Histórico: _____	
Ectoparasitos: () Sim () Não Qual: _____ Controle: _____	
Vacinado: AR: () Sim () Não ___/___ V10: () Sim () Não ___/___ LEISH: () Sim () Não ___/___	
Vermifugação: () Sim () Não ___/___	
Vômito: () Sim () Não Quantos? _____ Diarreia () Sim () Não _____	
Dados clínicos:	
Mucosas: Normocoradas () Hipocoradas () Hiperêmicas () Ictéricas ()	
TPC: < 2" () > 2" () Hidratação: Hidratado () Desidratado () _____%	
Linfonodos: Reativos () Não reativos ()	
Tegumentar : Hiperqueratose () seborreia () pústulas () Eritrematosa () Alopecia ()	
Onicogribose () Outros () _____	
Palpação abdominal: _____ Auscultação: _____	
Temperatura Retal: _____ °C	
Amostras coletadas: Sangue: C/edta () Sem edta ()	
Fezes ()	
Abrigos: Vermifugação ___/___ Dose: _____ Coleta de fezes e sangue _____	
Teste cutâneo : ___/___	
CCz: Eutanásia ___/___ Coletado: _____	
Resultados:	
Parasitológico: _____ Sorológico _____	

Anexo 2: Função logarítmica (Logxlogy), escolhida em programa de dosagem proteica para cálculo da concentração de proteínas no antígeno E/S *T. canis* definido em 310 microgramas/mL preparado.

