



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*ASCARIDIA* EM SORO DE FRANGOS

**Ellen Monteiro Ribeiro Santos¹; Aristeu Vieira da Silva²; Joelande Esquivel
Correia³**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ellenmonteiro28@hotmail.com
2. Orientador, Bolsista Produtividade em Pesquisa CNPq, Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: aristeuvsilva@uefs.br
3. Participante do projeto, Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: joelandecorreia@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Ascaridia*; ELISA; Especificidade.

INTRODUÇÃO

O processo de globalização associado aos avanços tecnológicos, propiciou o surgimento de grandes indústrias de produção animal responsáveis por criar em um sistema intensivo bovinos, suínos e aves. No entanto, a criação de aves em um sistema semi-intensivo ou extensivo ainda é recorrente em regiões rurais, peri-urbanas e pequenos municípios, como forma de consumo de subsistência e fonte de renda. Segundo Oliveira (2017) e Silva et al (2016), o sistema semi-intensivo, bem como fatores ambientais, são responsáveis por potencializar a infecção das aves por geohelmintos sendo mais recorrente as infecções por parasitos como *Toxocara* spp e *Ascaridia galli*.

Von Söhsten (2017) examinou o soro de 371 aves comercializadas em feira livre e criada em propriedades rurais, obtendo um resultado de 89,9% (80/89) e 93,3% (263/282) aves positivas ao ELISA para anticorpos IgY anti-*Toxocara*. Estudos experimentais demonstram que a presença de anticorpos séricos nas aves ocorre em torno de 21 a 28 dias após a inoculação (DA SILVA RAPOSO et al, 2016). Nesse sentido, as aves possuem o papel de indicadoras da contaminação ambiental em áreas onde os hospedeiros paratênicos estão infectados e o solo contaminado com *Toxocara* spp. (von SÖHSTEN, 2019).

Estudos experimentais acerca das infecções causadas pelos ascarídeos do gênero *Toxocara* e *Ascaridia* em aves ainda são recentes e segundo Raposo (2016), as infecções experimentais possibilitam uma avaliação mais concreta acerca da resposta humoral dos frangos frente a esses parasitos e uma melhor compreensão das reações cruzadas que ocorrem entre ambos, sendo uma ferramenta importante nesses estudos o teste imunoenzimático indireto (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

MATERIAL E MÉTODOS

O soro utilizado foi obtido após a centrifugação de amostras de 1 mL de sangue coletado de 24 aves experimentalmente infectadas no Laboratório de Fisiologia e Parasitologia Experimental (LaFiPE) em projetos anteriormente realizados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA/UEFS), pelos pareceres de 6 de fevereiro de 2017 (Registro 001/2017) e pelo parecer de 30 de outubro de 2017 (Ofício 36/2017).

Teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-*Toxocara*

Para pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* spp. foi realizado o teste imunoenzimático indireto (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) conforme descrito por Da Silva Raposo et al (2016) e Von Söhsten (2019) utilizando-se antígenos excretórios-secretórios de *Toxocara canis* – TES.

Padronização do teste ELISA para detecção de anticorpos anti-*Ascaridia*

Para execução do ensaio enzimático para detecção de anticorpos anti-*Ascaridia* foi utilizado como base a metodologia descrita por Da Silva Raposo et al (2016) e Von Söhsten (2019) para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* spp, com modificações: a sensibilização das placas de poliestireno foi realizada com antígenos totais de *Ascaridia galli* diluídos em solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2 (PBS) (1000 µg/mL); e os soros teste foram diluídos a 1/400. As demais etapas foram executadas conforme os artigos citados.

Em ambos os ensaios, o ponto de corte foi definido como a média mais ou menos dois desvios-padrões da densidade óptica dos resultados do grupo controle em cada semana após a inoculação. Amostras que apresentaram valores extremos foram excluídas por *outlier* com base nos desvios afim de reduzir a variação interna dos grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os soros das aves experimentalmente infectadas apresentaram reatividade a partir da segunda semana após inoculação, no entanto, os baixos valores de densidade óptica (DO) (Tabelas 1 e 2) encontrados podem estar relacionados a dose infectante OLLERO et al, 2008). Além disso, características individuais (animal) e da espécie examinada, afetam o tempo de soroconversão (CU ELLAR et al., 2001), a quantidade de anticorpos e consequentemente valores de DO.

Na quarta semana após infecção, o grupo inoculado com *Ascaridia galli*, o grupo com *A.galli* + *Toxocara* spp. e o grupo com *Toxocara* spp. foram considerados positivos ao ELISA anti-*Ascaridia*, evidenciando-se a ocorrência de reações cruzadas entre os parasitos devido a produção de proteínas similares. Em um estudo realizado no Nordeste do Brasil, amostras de soro adsorvidas com antígeno de *Ascaridia galli*, com intuito de minimizar as reações cruzadas entre *Toxocara* spp. e *A.galli*, apresentam uma redução de 15% na DO (ELEFANT et al., 2006; CAMPOS DA SILVA et al., 2015; von SOHSTEN et al., 2017).

Em um estudo experimental com aves (DA SILVA RAPOSO et al, 2016), observou-se que os índices de reatividade de frangos infectados com *Toxocara* spp. aumentavam de forma gradativa comportamento relacionado a tendência crônica característica da infecção.

Para a detecção de anticorpos anti-*Ascaridia*, o teste de Kruskal-Wallis indicou diferenças entre o grupo controle e o grupo *Ascaridia+Toxocara* na segunda semana pós-infecção, e entre controle e *Toxocara* na quinta semana (Tabela 1).

A despeito da possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, é possível afirmar que existe uma tendência de reações mais intensas ao antígeno de *Toxocara* naquelas aves infectadas exclusivamente por este parasito (Tabela 2).

Não foi possível acompanhar as aves por mais que as cinco semanas descritas neste estudo. A produção de anticorpos com maior avidéz poderia acentuar-se nas semanas seguintes, indicando reações mais específicas aos antígenos utilizados, como já reportado por da Silva Raposo et al (2016).

Tabela 1. Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-*Ascaridia* em soro de frangos experimentalmente infectados com *Ascaridia galli* ou *Toxocara canis* em Feira de Santana - BA, 2019.

Semana	Grupo	Mediana	P25	P75	Teste H	Valor de P
1	Controle	0,058 ^a	0,057	0,069	0,78	0,853
	<i>Ascaridia galli</i>	0,062 ^a	0,060	0,066		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,061 ^a	0,057	0,065		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,060 ^a	0,058	0,065		
2	Controle	0,063 ^a	0,057	0,064	11,18	0,010
	<i>Ascaridia galli</i>	0,074 ^{ba}	0,067	0,076		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,093 ^b	0,077	0,096		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,076 ^{ba}	0,072	0,093		
3	Controle	0,106 ^a	0,098	0,131	2,22	0,526
	<i>Ascaridia galli</i>	0,126 ^a	0,118	0,133		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,136 ^a	0,111	0,145		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,123 ^a	0,092	0,125		
4	Controle	0,186 ^a	0,184	0,192	11,16	0,010
	<i>Ascaridia galli</i>	0,211 ^{ba}	0,201	0,362		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,285 ^{ba}	0,268	0,314		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,301 ^b	0,291	0,308		
5	Controle	0,115 ^{ba}	0,102	0,119	10,45	0,015
	<i>Ascaridia galli</i>	0,103 ^a	0,096	0,110		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,120 ^{ba}	0,109	0,122		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,137 ^b	0,127	0,138		

Estatística: valores de médias seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis (Valor de P < 0,05).

Tabela 2. Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* em soro de frangos experimentalmente infectados com *Ascaridia* ou *Toxocara* em Feira de Santana - BA, 2019.

Semana	Grupo	Mediana	P25	P75	Teste H	Valor de P
0	Controle	0,059 ^a	0,058	0,064	10,57	0,014
	<i>Ascaridia galli</i>	0,055 ^a	0,054	0,056		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,064 ^a	0,062	0,066		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,072 ^a	0,067	0,073		
1	Controle	0,097 ^a	0,094	0,107	3,43	0,329
	<i>Ascaridia galli</i>	0,098 ^a	0,091	0,099		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,095 ^a	0,091	0,104		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,112 ^a	0,103	0,112		
2	Controle	0,085 ^a	0,084	0,087	4,97	0,176
	<i>Ascaridia galli</i>	0,088 ^a	0,087	0,092		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,094 ^a	0,092	0,095		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,096 ^a	0,092	0,097		
3	Controle	0,113 ^a	0,112	0,125	4,22	0,238
	<i>Ascaridia galli</i>	0,138 ^a	0,130	0,144		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,126 ^a	0,126	0,138		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,124 ^a	0,115	0,125		
4	Controle	0,137 ^a	0,119	0,139	7,27	0,063
	<i>Ascaridia galli</i>	0,153 ^a	0,152	0,223		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,175 ^a	0,167	0,178		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,143 ^a	0,130	0,165		
5	Controle	0,147 ^{ba}	0,142	0,196	8,68	0,033
	<i>Ascaridia galli</i>	0,141 ^a	0,117	0,142		
	<i>A.galli</i> + <i>Toxocara</i> spp.	0,150 ^{ba}	0,149	0,161		
	<i>Toxocara</i> spp.	0,216 ^b	0,201	0,252		

Estatística: valores de médias seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis (Valor de P < 0,05).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos é possível inferir que em estudos experimentais acerca das parasitoses causadas pelo *Toxocara* spp e *Ascaridia galli*, as aves são viáveis como objeto de estudo pois possuem uma soroconversão precoce quando comparado com outros hospedeiros paratênicos, atuando como indicadores da contaminação ambiental.

Estudos futuros são necessários para avaliar a sustentação dos padrões encontrados nos resultados do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- CAMPOS-DA-SILVA, Danielle R. et al. Natural infection of free-range chickens with the ascarid nematode *Toxocara* sp. *Parasitology Research*, [s.l.], v. 114, n. 11, p.4289-4293, 29 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4669-7>.
- CU ELLAR, C., Fenoy, S., del Aguila, C., Guill_en, J.L. Isotype specific immune responses in murine experimental toxocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 549-553, 2001.
- DA SILVA RAPOSO, R.S. et al. Kinetic and avidity of IgY anti-*Toxocara* antibodies in experimentally infected chickens. *Exp Parasitol*, v. 171, n. 12, p. 33-41, 2016.
- ELEFANT GR, Shimizu SH, SanchezMC, JacobCM, Ferreira AW. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG IgA and IgE antibodies by enzymelinked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Laboraopry Analysis*, v. 20, p. 164–172, 2006
- OLIVEIRA, Adilson Cardoso de. Frequência de Anticorpos Anti-*Toxocara* em Frangos Criados em Sistema Semi-intensivo, no Norte do Paraná,Sul do Brasil. 2015. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Aminal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente-sp, 2017.
- OLLERO, M.D., Fenoy, S., Cu_ellar, C., Guill_en, J.L., Del Aguila, C. Experimental toxocariosis in BALB/c mice: effect of the inoculation dose on brain and eyeinvolvement. *Acta Trop*, v. 105, p. 124-130, 2008.
- SILVA, Gs da et al. Helminthic Parasites of Chickens (*Gallus Domesticus*) in Different Regions of São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, [s.l.], v. 18, n. 1, p.163-168, mar. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/18069061-2015-0122>.
- von SÖHSTEN, A.L. et al. Anti-*Toxocara* spp. IgY antibodies in poultry sold in street markets from Feira de Santana, Bahia, Northeastern Brazil. *Vet Parasitol: Reg Studies Rep*, v. 8, n. 5, p. 86-89, 2017.
- von SÖHSTEN, A.L. et al. Infecção humana, aviária e a contaminação do solo pelo *toxocara* spp em uma comunidade rural de Feira de Santana, BA. 2019. 111 f. Tese (Doutorado) – Curso de Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA,2019.