

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-TOXOCARA SP EM GALINHAS
CAIPIRAS NO ESPÍRITO SANTO**

DANIELLE RIBEIRO CAMPOS DA SILVA

VILA VELHA
MAIO/2013

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-TOXOCARA SP EM GALINHAS
CAIPIRAS NO ESPÍRITO SANTO**

DANIELLE RIBEIRO CAMPOS DA SILVA

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira

VILA VELHA

MAIO/2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

S586p Silva, Danielle Ribeiro Campos da.

Pesquisa de anticorpos anti-toxocara sp em galinhas caipiras no Espírito Santo / Danielle Ribeiro Campos da Silva. – 2013.

54 f. : il.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Toxocaríase humana. 2. Larva migrans visceral. 3. Experiência com animais – Espírito Santo (ES). 4. Sorologia veterinária. I. Pereira, Fausto Edmundo Lima. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615.7


DANIELLE RIBEIRO CAMPOS DA SILVA

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-TOXOCARA SP EM GALINHAS
CAIPIRAS NO ESPÍRITO SANTO**

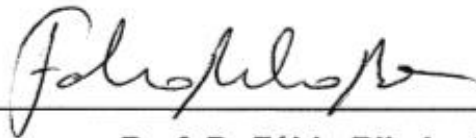
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 28 de Maio de 2013.

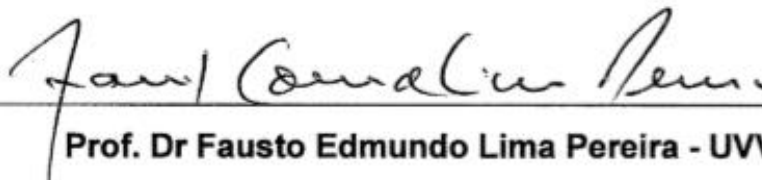
Banca examinadora:



Prof. Dr^a Elenice Moreira Lemos - UFES



Prof. Dr Fábio Ribeiro Braga - UVV



Prof. Dr Fausto Edmundo Lima Pereira - UVV

(Orientador)

**Agradecimento especial à Fundação Nacional de Desenvolvimento
do Ensino Superior Particular (FUNADESP) e a Universidade Vila
Velha-ES pelo financiamento do projeto.**

Dedico este trabalho às pessoas que mais amo, em especial ao meu marido, pelo apoio incondicional e paciência, aos meus pais pela ajuda e incentivo, à minha irmã que mesmo longe sempre esteve presente e me deu força para continuar e aos meus amigos que entenderam a minha ausência e me ajudaram ao longo do percurso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo;

Ao meu orientador, o prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, por todo apoio, disponibilidade e conhecimento que, brilhantemente, deu-me durante todo curso e, especialmente, pela confiança em mim depositada ao assumir a orientação.

Ao prof. Dr. Luiz Carlos Pedrosa Valli, pela co-orientação e ajuda nas dosagens imunológicas.

Ao prof. MSc Marcus Alexandre Vaillant Beltrame, pela co-orientação e fornecimento de grande parte das amostras analisadas.

À prof.^a. Dr^a Suely Gomes de Figueredo, Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo, pela ajuda no preparo do extrato de ascarídeos.

À prof.^a. MSc Mayra Cunha Flecher, pela ajuda na obtenção do nematoide *Toxocara canis* para inoculação dos ovos em galinhas caipiras.

À Universidade Vila Velha – UVV, Laboratório de Microbiologia e Laboratório Clínico do curso de Medicina Veterinária e o Laboratório de Peixes por parte da estrutura necessária para realização deste trabalho.

À Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM, Laboratório de Imunologia, pela estrutura necessária aos ensaios de ELISA realizados.

As alunas de iniciação científica Jeanne Saraiva da Paz e Viviane Raposo Fortunato, pela participação ativa no trabalho e parceria.

À minha mãe, por ceder amostras de suas galinhas caipiras de criação para a pesquisa e por cuidar das galinhas expostas à infecção natural me ajudando no desenvolver da pesquisa.

À minha amiga e prof.^a Dr^a. Ana Raquel de Medeiros Garcia, pelo incentivo constante, ensinamentos e carinho durante todo o percurso.

Aos professores, que sedimentaram os conhecimentos necessários para a realização desse trabalho.

Ao meu Marido, Marcus Kiefer, por entender a minha ausência, não me deixar desistir e me incentivar constantemente.

A todas as pessoas que conheci durante essa jornada, seja nas salas de aulas ou nos laboratórios da UVV, EMESCAM e UFES e que de alguma forma, proporcionaram a execução deste trabalho.

RESUMO

Campos-da-Silva, Danielle Ribeiro. Mestre em Ciências. Universidade Vila Velha – ES, Maio de 2013. **Pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* sp em galinhas caipiras no Espírito Santo**. Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Casos de toxocaríase humana adquirida por ingestão de fígado cru de aves têm sido relatados. Como as galinhas de criação extensiva são criadas em ambientes onde coabitam cães e gatos, é possível que ingiram ovos de *Toxocara* sp. Larvas do parasita podem persistir nos tecidos por longos períodos. Não existem publicações sobre a prevalência de infecção natural de galinhas com *Toxocara*, mas experimentalmente são facilmente infectadas. O objetivo foi avaliar, em uma amostra de galinhas caipiras do Estado do Espírito Santo, a presença de anticorpos anti-*Toxocara* sp como indicadores de infecção com nematóides do gênero *Toxocara*. Como método foi utilizado teste ELISA, com antígenos de secreção e excreção do *T. canis*. Controles negativos: soros de 20 frangos de granja industrial de alto padrão higiênico. Controle positivo: soro de uma galinha de granja, previamente infectada com ovos embrionados de *T. canis*. Todos os soros foram previamente adsorvidos com extrato de *Ascaridia galli*, para reduzir reações cruzadas. O ponto de corte foi a média dos controles negativos mais quatro DP. Foram investigados 157 soros do Estado, sendo 61 de galinhas originadas de pequenas propriedades do interior do Estado, 28 de um abatedouro de galinhas caipiras em Vila Velha, 21 de galinhas criadas em quintais de duas casas em Vila Velha e 47 de galinhas necropsiadas no Departamento de Patologia Veterinária da Universidade de Vila Velha. Os resultados mostraram que 58,5% das galinhas caipiras avaliadas tiveram ELISA com DO acima do ponto de corte e 12,7% tiveram DO acima da observada no controle positivo. Resultados positivos acima do valor do controle positivo podem ser interpretados seguramente como positivos. Resultados positivos abaixo do controle positivo podem ser interpretados como títulos mais baixos de anticorpos em animais infectados, cicatriz sorológica de infecção passada ou reações cruzadas com outros nematóides intestinais que não o *A. galli* utilizado na adsorção dos soros. A alta prevalência de anticorpos anti-*Toxocara* sp em galinhas caipiras do Espírito Santo indicam ser frequente a infecção com esse nematóide, existindo o risco de contaminação humana pela ingestão de vísceras cruas dessas galinhas.

Palavras chaves: *Toxocara*, toxocaríase, galinhas caipiras, anticorpo anti-*Toxocara*

ABSTRACT

Campos-da-Silva, Danielle Ribeiro. Master in Sciences. Universidade Vila Velha – ES, May 2013. **Anti-*Toxocara* antibodies in free-range chickens from Espírito Santo State**. Advisor: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Cases of human toxocariasis acquired by eating raw liver of chicken, turkey and ostrich has been reported. Free-range chickens frequently are reared in environments in which dogs and cats roam freely, with high risk of ingestion of *Toxocara* eggs. Larvae of the parasite may persist for long periods in tissues of those birds. There are no reports on the prevalence of natural infection of chickens with *Toxocara*, but they are easily experimentally infected. The objective was to evaluate the presence of anti-*Toxocara* sp antibodies as indicators of natural infection with *Toxocara* sp, in a sample of chickens from Espírito Santo State, Brazil. An ELISA test with secretion and excretion *Toxocara canis* antigens was used. Negative controls were sera from 20 industrial chickens reared in a high hygiene standard environment and positive control serum was from a chicken infected with embryonated eggs of *T. canis*, in which larvae of the parasite were detected. All sera were previously adsorbed with *Ascaridia galli* extract to reduce cross-reactivity. The cut-off was the mean plus four SD of OD observed in control group. Were investigated 157 sera from free-range chicken from different regions of the State, 61 chickens sourced from smallholdings in the state, 28 from a slaughterhouse or free range chickens at Vila Velha, 21 hens reared in backyards of two houses in Vila Velha, and 47 from necropsies at the Department of Pathology, University of Vila Velha-ES. The results showed that 58,5% of chickens presented positive results in ELISA test: 12,7% had OD over the value for the positive control serum and may be safely interpreted as infected chickens. However results with OD between the cut-off and the positive control serum are more difficult to interpret: may be consequence of infections with low titers of antibodies or may represent serum scar of past infection; moreover they may be result of cross reaction with other nematodes than *A. galli*, used for adsorption of sera. The high prevalence of *Toxocara* sp antibodies in free-range chickens from Espírito Santo State may be an indication of frequent infection of these birds with the nematode. In addition, is an indirect evidence of risk of human contamination by ingestion of raw viscera of these chickens.

Key-words: *Toxocara*, chicken, free-range chicken, anti-*Toxocara* antibodies

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência de resultados de ELISA anti- <i>Toxocara</i> sp considerados positivos ($DO \geq 0,350$) e resultados considerados indeterminados ($0,135 < DO < 0,350$) em 157 soros de galinhas de criação extensiva (caipiras) originadas de diversas localidades do Espírito Santo.	35
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Resultados do ELISA para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* sp em amostras seriadas da galinha controle positivo. A linha tracejada representa o ponto de corte 0,135 DO. A linha pontilhada representa o valor considerado positivo $DO \geq 0,350$ após 132 dias de infecção experimental. 34
- Figura 2 Resultados do ELISA para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* sp em galinhas. A linha tracejada representa o ponto de corte (média + quatro vezes o DP dos controles negativos). A linha pontilhada representa a densidade óptica observada em uma galinha sabidamente infectada com o *Toxocara canis* (DO=0,350). 36
- Figura 3 Fotomicrografia de campo microscópico de esmagado de fragmento de rim entre duas lâminas de vidro mostrando a larva de *Toxocara canis* (seta preta) em galinha controle, infectada experimentalmente com ovos embrionados de *Toxocara canis* (132 dias após infecção). 37

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
>	Maior
≥	Maior e igual
<	Menor
cm	Centímetro
DP	Desvio padrão
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme Link Sorbent Assay (Teste Imunoenzimático)
EMESCAM	Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
ES	Espírito Santo
g	Gramas
IgY	Imunoglobulina Y
L2	larvas no estagio 2
L3	larvas no estagio 3
LMV	Larva Migrans Visceral
PBS	Tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
M	Molar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Kg	Kilograma
n	Número de amostras
rpm	Rotações por minuto
TES	Antígeno do <i>Toxocara canis</i> de excreção e secreção
UVV	Universidade Vila Velha
VV	Vila Velha
µL	Microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 Alguns aspectos biológicos do nematóides do gênero <i>Toxocara</i> sp	15
1.2 Ciclo biológico do <i>Toxocara canis</i> em canídeos.....	15
1.3 Ciclo biológico do <i>Toxocara cati</i> em felinos.....	16
1.4 Infecção de hospedeiros paratênicos com <i>Toxocara canis</i> ou <i>Toxocara cati</i>	16
1.5 Epidemiologia da toxocaríase. Infecção com o <i>Toxocara</i> sp no Espírito Santo ..	17
1.6 Aves como hospedeiros paratênicos de <i>Toxocara</i> sp	18
1.7 A Toxocaríase Humana adquirida pela ingestão de carne e vísceras de aves cruas ou mal cozidas.....	23
1.8 Toxocaríase humana adquirida pela ingestão de carne e vísceras cruas ou mal cozidas de outros animais hospedeiros paratênicos do <i>Toxocara</i>	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos gerais.....	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Aspectos éticos	29
3.2 Amostras	29
3.3 Coleta de sangue e obtenção de soros	30
3.4 Obtenção do controle positivo	30
3.5 Execução do teste imunoenzimático (ELISA) para detecção dos anticorpos anti- <i>Toxocara</i> sp.....	30
3.5.1 Obtenção do Antígeno de <i>Toxocara canis</i> de excreção e secreção (TES)	31
3.5.2 Preparo do extrato de <i>Ascaridia galli</i>	31
3.5.3 Sensibilização da placa	31
3.5.4 Bloqueio da placa	31
3.5.5 Adsorção do soro com extrato antigênico de <i>Ascaridia galli</i> e incubação da placa.....	32
3.5.6 Adição do conjugado (anti-IgY marcado com peroxidase)	32
3.5.7 Adição do Substrato (TMB Cromogen).....	32
3.5.8 Adição da solução de interrupção da reação com o cromógeno	32
3.5.9 Leitura da Densidade Óptica (DO)	32

3.6 Pesquisa de larvas nos fígados das galinhas originadas de abatedouros e na galinha controle positivo.	33
3.7 Estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÃO.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICES.....	50
APÊNCICE I - Distribuição da frequência de galinhas com resultados verdadeiramente positivos e entre o ponto de corte e a DO da galinha controle positivo para anticorpos anti- <i>Toxocara</i> sp através do teste de ELISA, segundo o município de procedência no Estado do Espírito Santo.....	51
APÊNCICE II - Resultados da pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxocara</i> sp através do teste de ELISA segundo o município de procedência no Estado do Espírito Santo..	52

INTRODUÇÃO

Foram descritos vários casos humanos de Toxocaríase em pacientes que adquiriram o parasita ingerindo vísceras de aves cruas, incluindo galinhas (Lee et al, 1976; Nagakura et al, 1989; Morimatsu et al, 2006; Hoffmeister et al, 2007; Noh et al 2012). As infecções experimentais de aves com o *Toxocara* sp têm sido mostradas em codornas (Pahari & Sasmal, 1990a; Pahari & Sasmal, 1990b; Nakamura et al, 1991; Maruyama, Yamoto e Katsube, 1994b), pombos (Galvin, 1964; Beaver, 1956) e galinhas (Galvin, 1964; Okoshi e Usui, 1967; Agnihotri, Bhatia e Kumar, 1987; Maruyama et al, 1994a; Gargili et al, 1999; Tuzer et al, 2002; Taira, Pernim e Kapel, 2003; Taira et al, 2004; Azizi et al, 2007; Oryan, Sadjjadi e Azizi, 2010; Taira, Saitoh e Kapel, 2011; Taira et al, 2012), demonstrando-se também que as larvas podem permanecer viáveis nas vísceras e carcaças, conservando o seu potencial infectivo (Pahari & Sasmal, 1990b; Maruyama, Yamoto e Katsube, 1994b; Tuzer et al, 2002; Taira et al, 2004; Taira, Saitoh e Kapel, 2011). Taira e colaboradores (2012) também demonstraram que larvas em fígados de galinhas permaneceram viáveis por 15 dias após terem sido conservadas em temperaturas de resfriamento (4°C). Há, portanto risco de se adquirir *Toxocara* sp ingerindo fígado de galinha cru, como é costume em algumas comunidades. No entanto, não existem estudos avaliando com que frequência galinhas podem se infectar naturalmente pelo *Toxocara* sp, não se conhecendo o potencial risco de se adquirir o parasita pela ingestão de vísceras cruas dessas aves. Como as galinhas de criação extensiva são expostas a ambientes frequentados por cães e gatos, passíveis, portanto de estarem contaminados com ovos de *Toxocara canis* e ou de *Toxocara cati* e como essas aves têm o hábito de catar para ingerir não só alimentos (insetos, sementes, etc.), mas também areia, para auxiliar a trituração dos alimentos na moela, o risco de ingerirem ovos de parasitas é grande. De fato é bem demonstrada a alta prevalência de *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras, inclusive no estado do Espírito Santo (Beltrame et al, 2012), o que indica a possibilidade dessas galinhas adquirirem outros parasitas.

Pelo exposto decidiu-se investigar a prevalência de anticorpos anti-*Toxocara* sp em galinhas de criação extensiva (caipiras) originadas de diversas regiões do estado do Espírito Santo para avaliar o potencial risco de transmissão de larvas do *Toxocara* sp pela ingestão de vísceras cruas desses animais no nosso meio.

Nesta dissertação será apresentada uma breve revisão da literatura sobre o *Toxocara canis* e o *Toxocara cati* e uma revisão mais detalhada sobre a infecção de

aves com *Toxocara cati* e *Toxocara canis* e sobre o seu potencial papel na transmissão do parasita para outros hospedeiros carnívoros.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Alguns aspectos biológicos dos nematóides do gênero *Toxocara*

O *Toxocara* é um dos maiores gêneros de ascarídeos cujos adultos são parasitas do intestino delgado de vários mamíferos. Pertence ao filo Nematelminthes, classe Nematoda, ordem Ascarididae, família Ascaridae e subfamília Toxocarinae. *Toxocara canis* e *Toxocara cati* são as duas espécies mais comuns, de ampla distribuição geográfica, comumente encontrados em cães e gatos, respectivamente. Outras espécies de *Toxocara* incluem as encontradas em elefantes, hipopótamos, morcegos, gato almiscarado, ratos, quatis, mangustos e bezerras (Bowman et al, 2006).

Os vermes adultos vivem no intestino delgado do hospedeiro no cão. A fêmea do *T. canis* possui elevada postura de ovos, que são muito resistentes, podendo permanecer viáveis por tempo prolongado no solo. As fêmeas são extremamente fecundas, um verme pode contribuir com cerca de 700 ovos para cada grama de fezes por dia, não sendo incomuns contagens de até 15.000 ovos por grama de fezes (Urquhart et al, 1998). Os ovos nas fezes não são embrionados e, portanto, não são infectantes. Para que haja o embrionamento, são necessárias condições adequadas de temperatura (15 a 35 °C) e umidade, sendo que, nessas condições, 85% dos ovos tornam-se infectantes no período de 2 a 5 semanas (Bowman et al, 2006; Rubinski-Elephnat, 2010).

1.2 Ciclo biológico do *Toxocara canis* em canídeos

A infecção natural de cães pode se fazer basicamente por quatro modos: **(a) ingestão de ovos com larva infectante:** os ovos ingeridos eclodem no intestino delgado e as larvas infectantes (L2) seguem pela circulação sanguínea, via fígado, para os pulmões. Entram nos alvéolos onde sofrem muda, migram para os bronquíolos, brônquios e traquéia chegando a laringe e faringe, sendo deglutidas, atingindo o intestino delgado onde sofrem a maturação para vermes adultos. Algumas larvas não chegam aos pulmões, indo se localizar em outros tecidos (migração somática) onde podem permanecer dormentes por longos períodos, sendo esse fato fundamental para a transmissão placentária do parasita. A migração pulmonar é reduzida no cão após um ou dois meses de vida, quando se mantém a migração somática. Desse modo o cão adulto raramente apresentará o verme no intestino, mas poderá apresentar larvas dormentes nos tecidos, importantes nas fêmeas, para a transmissão placentária. **(b) ingestão de larva contidas em tecidos**

de hospedeiros paratênicos: cães podem ingerir larvas contidas nos tecidos de hospedeiros paratênicos as quais completam o ciclo; **(c) via transplacentária:** larvas de infecção recente por ingestão de ovos ou larvas dormentes nos tecidos da cadela prenha são ativadas (provavelmente pela progesterona) e migram para a placenta caindo na circulação fetal e após o nascimento migram para os pulmões completando o ciclo. Admite-se que uma cadela, infectada, abriga larvas suficientes para infectar todas as ninhadas subsequentes (Urquhart et al, 1998). **(d) via amamentação:** larvas migrantes da cadela na fase final da gestação atingem as mamas e são excretadas no leite nas primeiras semanas da lactação; os filhotes se infectam ingerindo essas larvas, embora haja dúvidas se elas completam o ciclo após a deglutição (Urquhart et al, 1998; Despommier, 2003; Bowman et al, 2006). A cadela pode ainda reinfectar-se mediante ingestão dos estágios de larvas nas fezes frescas e vômitos dos filhotes no momento em que estão fazendo a higienização dos mesmos (Taylor, Coop e Wall, 2010).

1.3 Ciclo biológico do *Toxocara cati* em felinos.

Os padrões de migração do *T. cati* diferem qualitativamente do *T. canis*: (a) não ocorre infecção placentária; e (b) na infecção por ingestão de ovos larvados, a probabilidade de migração traqueal permanece alta por toda a vida do gato, favorecendo a instalação de vermes no intestino durante toda a vida. (Bowman et al, 2006).

1.4 Infecção de hospedeiros paratênicos com *Toxocara canis* ou *Toxocara cati*

Várias espécies de mamíferos, incluindo o homem, podem se infectar com ovos do *Toxocara* sp que liberam larvas no intestino as quais migram para os tecidos mas não completam o seu ciclo evolutivo, tal como ocorre nos seus hospedeiros habituais (cães e gatos). Nessas condições fala-se que os hospedeiros são paratênicos. Além de mamíferos, aves e mesmo invertebrados como minhocas podem ser infectados quando ingerem ovos embrionados de *Toxocara* sp (Bowman et al, 2006).

A contaminação humana com ovos de *Toxocara* sp se faz geralmente pela ingestão de ovos com alimentos ou água contaminados ou através de mãos não lavadas que entraram em contato com solo contaminado com ovos. Geofagia é frequente em crianças com toxocaríase, sendo esse hábito considerado importante risco para a infecção. No entanto tem sido demonstrado que a contaminação pode

ser feita através da ingestão de larvas contidas em carnes ou vísceras mal cozidas que contenham as larvas do parasita, tendo sido descrito casos de infecção humana após a ingestão de vísceras de porco, coelho (Stürchler, Weiss e Gassner, 1990), carneiro (Salem e Schantz, 1992) e aves (Nagakura et al, 1989). Este meio de transmissão foi reproduzido experimentalmente em camundongos com a administração de fígado de porcos infectados com larvas de *T. canis* (Sasmal, Acharya e Laha, 2008).

No homem as larvas migrantes podem produzir quadros clínicos, que incluem larva migrans visceral (forma sistêmica), larva migrans ocular e meningoencefálica (formas localizadas) e formas mal definidas, oligossintomáticas denominadas toxocaríase encoberta (Jacob et al, 1994; Pawlowski, 2001; Despommier, 2003; Rubinski-Elephnat, 2010; Carvalho e Rocha, 2011). No entanto, a maioria das pessoas infectadas é assintomática (Fragoso et al, 2011).

A forma clássica da toxocaríase humana é a larva migrans visceral, descrita por Beaver e colaboradores em 1952, como doença relativamente benigna, caracterizada por eosinofilia, manifestações pulmonares e hepatomegalia, atingindo principalmente crianças de 1 a 5 anos de idade. A larva migrans ocular, descrita por Nichols em 1956, resulta da migração das larvas para os olhos, podendo causar coriorretinite, uveíte, estrabismo e até cegueira (Shields, 1984). Ocorre geralmente em crianças acima de 4 anos de idade e em adultos sem outros sinais clínicos, com baixos níveis de anticorpos, além da eosinofilia não ocorrer habitualmente. Toxocaríase do sistema nervoso central (formas meningoencefálicas) são raras, mas tem sido descritas em crianças e adultos (revisão em Moreira-Silva et al, 2004).

Uma forma menos definida de toxocaríase humana, assintomática, em crianças com sorologia positiva, com ou sem eosinofilia foi denominada de toxocaríase encoberta (Bass e Mehta, 1983).

1.5 Epidemiologia da toxocaríase humana. Infecção humana com *Toxocara* sp no Espírito Santo

A infecção com *Toxocara* sp tem ampla distribuição geográfica, com maior frequência em regiões menos desenvolvidas (Rubinski-Elephnat, 2010). No Brasil estudos especialmente de escolares, têm mostrado prevalências que variam de 2,8 a 54,8% (Carvalho e Rocha, 2011; Fragoso et al, 2011). No estado do Espírito Santo a infecção de crianças pelo *T. canis* é frequente, conforme demonstrado pela pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* sp em crianças internadas no Hospital Infantil

Nossa Senhora da Glória-HINSG (Moreira-Silva et al, 1998; Musso et al, 2007) e em escolares matriculados no primeiro ano em escolas públicas de Vitória (Fragoso et al, 2011). Granulomas hepáticos produzidos por *Toxocara* sp foram encontrados em 2,3% de necrópsias realizadas no HINSG (Musso et al, 2006). Também tem sido relatado em Vitória que a infecção com *Toxocara* predispõe a infecções estafilocócicas em crianças (Moreira-silva et al 2000; Moreira-Silva et al, 2002).

1.6 Aves como hospedeiros paratênicos de *Toxocara* sp

As primeiras referências sobre infecção de galinhas e pombos foram citadas na publicação de Galvin (1964), que, na introdução, cita Sprent (1956), que infectou pintos com *Toxocara cati* e somente recuperou larvas até 10 dias após a infecção e Beaver (1956) que infectou galinhas e pombos com *Toxocara canis* mostrando que as larvas eram recuperadas até três meses após a infecção. No entanto, é a publicação de Galvin (1964) o primeiro relato sistematizado de infecção de aves pelo *Toxocara canis*. O autor relata a infecção de galinhas e pombos com 1500 ovos embrionados de *Toxocara canis* e a recuperação de larvas entre 1 e 141 dias após a infecção. Mostrou que a maior frequência de recuperação de larvas, tanto nas galinhas como nos pombos, ocorreu no fígado, nos diferentes tempos após a inoculação. O número de larvas recuperados depois de 120 dias de inoculação eram menores mas representavam mais de 50% do que se recuperava nos 120 dias anteriores. A recuperação de larvas, nos diferentes dias após a inoculação foi sempre menor nos pombos. Esses resultados mostraram que as larvas do *Toxocara* sp persistem nas vísceras das galinhas e pombos por um longo período de tempo. O estudo histológico mostrou lesões semelhantes nos pombos e galinhas, embora com diferenças na intensidade. Nas primeiras semanas havia focos de necrose com infiltração de células inflamatórias e granulomas com necrose e células gigantes eram observados após 90 dias de infecção. As lesões eram menos extensas e frequentes nas galinhas. Todas as larvas vistas nos cortes histológicos estavam aparentemente íntegras, indicando que deviam estar vivas antes da fixação dos tecidos.

Okoshi e Usui (1968) infectaram galinhas com *Toxascaris leonina*, *T. canis* e *T. cati*. Para o *T. canis* a recuperação de larvas foi maior no fígado, decrescente entre 25 e 90 dias após a infecção. Ao contrário, as larvas foram pouco frequentes na carcaça; Na infecção com *T. cati* as larvas só foram recuperadas no fígado até 16 dias após a infecção, mas a recuperação de larvas na carcaça foi maior, em todo o

período após a infecção. Na infecção com *T. leonina* o padrão de distribuição de larvas foi bem diferente: muitas larvas no intestino até 32 dias após a infecção com número pequeno de larvas recuperadas de outras vísceras. Esses autores também infectaram invertebrados (minhocas e baratas). Minhocas se infectaram tendo sido recuperadas larvas de seus tecidos; baratas, embora tenham ingerido ovos que apareceram juntamente com larvas nas fezes, não apresentaram larvas nos tecidos, portanto não se infectaram. Mostraram ainda que camundongos e galinhas inoculados com larvas recuperadas das minhocas adquiriram a infecção, confirmando a infectividade dessas larvas.

Autores russos descreveram a infecção e as lesões observadas em galinhas infectadas com ovos embrionados de *Toxocara canis* (Smirnov, 1975; Tsvetaeva, Sosipatrova e Smirnov, 1979). Não tivemos acesso a detalhes dessas investigações porque os dois trabalhos foram publicados em russo. Outra publicação em revista indiana relatou infecção de galinhas para estudo do comportamento migratório das larvas (Sharma e Bhatia, 1983, apud Agnihotri, Bhatia e Kumar, 1987).

Agnihotri, Bhatia e Kumar (1987) descreveram o comportamento migratório das larvas do *T. canis* em galinhas inoculadas com 5.000 ovos e necropsiadas 15, 22, 32, 42 e 58 dias após a infecção. O principal órgão onde houve a recuperação das larvas foi o fígado e o máximo de larvas recuperadas ocorreu 15 dias após a infecção, com uma redução irregular mostrada nos intervalos seguintes. Poucas larvas foram recuperadas do pulmão, cérebro e músculos, resultados semelhantes aos anteriormente referidos por Galvin (1964) e Okoshi e Usui (1967). Concluem que as galinhas são uma fonte para a infecção de homem e carnívoros com larvas de *Toxocara canis*.

Na década de 1990 autores japoneses publicaram resultados da infecção de codornas com *T. canis*. Na primeira publicação relataram a infecção das codornas com 5000 ovos de *Toxocara canis*, tendo recuperado a maior quantidade de larvas no fígado do que em outras vísceras, seis e 12 dias após a infecção. Demonstraram ainda que camundongos adquiriram a infecção após inoculação de larvas colhidas do fígado de codornas infectadas, confirmando a infectividade das larvas (Pahari & Sasmal, 1990a). Em outra publicação repetiram a inoculação em codornas e demonstraram que cães que ingeriram fígado das codornas infectadas adquiriram infecção patente, eliminando ovos do *Toxocara canis* nas fezes 38 dias após a ingestão da víscera contendo as larvas do parasita (Pahari & Sasmal, 1990b). Para tentar verificar uma possível fonte natural de infecção para as codornas os

mesmos autores expuseram minhocas a ovos do *Toxocara canis* (contaminando o solo onde as minhocas eram acondicionadas) e verificaram que larvas do parasita eram observadas migrando nos tecidos dos anelídeos durante 16 dias; mostraram ainda que as codornas que ingeriram minhocas previamente infectadas com *Toxocara canis* adquiriram o parasita, apresentando larvas nas vísceras especialmente no fígado. Os autores discutiram a participação de minhocas na disseminação de parasitas paratênicos (Pahari & Sasmal, 1991).

Nakamura e colaboradores (1991) inocularam codornas com 1500, 4000 ou 15000 ovos embrionados de *Toxocara canis*. Confirmaram as observações anteriores que a recuperação de larvas era sempre maior no fígado do que em outras vísceras. O estudo anatomopatológico mostrou lesões necróticas e infiltrados inflamatórios em relação com as larvas e formação de granulomas, lesões essas mais frequentes e extensas nos animais que receberam maiores inóculos.

Maruyama e colaboradores (1994a) infectaram galinhas com 1500 ovos embrionados de *Toxocara canis* que foram eutanasiadas 1, 3, 6, 10, 30 e 50 dias após a infecção. Recuperaram larvas das vísceras, especialmente do fígado e músculos, mas em proporção muito maior no fígado. O estudo histológico mostrou, no fígado, infiltrado inflamatório de linfócitos e células acidofílicas desde o primeiro dia após a infecção. Após 10 dias observaram granulomas formados de linfócitos e células acidofílicas com tecido fibroso na periferia. Os autores concluem que nas galinhas as larvas tendem a se localizar no fígado e nos músculos, podendo ser fonte de infecção para pessoas que tem o hábito de ingerir carne e vísceras cruas.

Para testar a infectividade de larvas colhidas de vísceras de hospedeiros paratênicos infectados com o *Toxocara*, Maruyama, Yamamoto e Katsube (1994b) repetiram e ampliaram os experimentos de Pahari e Sasmal (1990a) confirmando em camundongos que as larvas colhidas de fígado de codornas inoculadas infectam facilmente os camundongos.

Gargili e colaboradores (1999) repetiram os experimentos de Okoshi e Usui (1968), Agnithori, Bhatia e Kumar (1987) e Maruyama e colaboradores (1994a) tentando estabelecer a distribuição das larvas nos tecidos de galinhas. Infectaram 5000 ovos embrionados de *T. canis* em 30 pintos. Necropsiaram os pintos de 2 em 2 dias até 12 dias após a inoculação e observaram que há predileção das larvas pelo fígado (>90%), seguido pelo pulmão e raramente foram encontradas no cérebro em todos os dias analisados. Não foram encontradas larvas nas carcaças examinadas. Confirmaram os resultados dos outros autores e relataram que não observaram

desordens comportamentais desses animais. O mesmo grupo de Gargili e colaboradores (Tuzer et al, 2002) repetiu e ampliou os experimentos de Pahari e Samal (1990a) e de Maruyama, Yamamoto e Katsube (1994b), pesquisando a larva migrans visceral em camundongos após a ingestão de fígados de galinhas infectadas com ovos de *T. canis*. O grupo com seis camundongos, chamado de “grupo ovo”, foram infectados diretamente com números diferentes de ovos embrionados de *T. canis* (5.000, 2.500 e 1.250 ovos à dupla). O outro grupo, chamado de “grupo fígado”, divididos em 6 subgrupos (L1-L6), com 5 a 8 camundongos em cada subgrupo, foram infectados com fígados de pintos previamente inoculados com 5.000 ovos embrionados de *T. canis*. Os pintos foram necropsiados de 2 em 2 dias após a inoculação e os fígados de cada necrópsia serviram de alimento para um determinado subgrupo de camundongos. Sete camundongos do “grupo fígado” morreram antes da data da necrópsia, e os dois camundongos do “grupo ovo”, infectados com 5.000 ovos morreram em três dias. Os autores observaram que o grupo de camundongos que se alimentou com o fígado infectado com larvas tiveram mais frequentes manifestações clínicas (mais cansados, com a pelagem dura e emaranhada, pálpebras fechadas e falta de coordenação motora) e tiveram maior número de larvas recuperadas no pulmão do que os infectados com ovos embrionados.

Taira, Permin e Kapel (2003) infectaram galinhas com 5.000, 10.000 ou 20.000 ovos embrionados e realizaram as necropsias 1, 3 e 6 dias após a infecção. Mostrou que a maior migração de larvas no período observado foi para o fígado e pulmões (87% das larvas recuperadas). Para confirmar a infectividade de larvas contidas nas vísceras de galinhas Taira e colaboradores (2004) alimentaram porcos com fígado de galinha contendo larvas do *Toxocara*, incluindo amostras mantidas em refrigerador por uma semana. Larvas foram recuperadas nas vísceras dos porcos, em maior quantidade nos fígado e pulmões. No fígado dos porcos eram observados numerosos pontos brancos indicativos da presença de larvas. Além da demonstração das larvas migrantes nos tecidos dos porcos, os autores demonstraram que todos desenvolveram anticorpos anti-*Toxocara* sp detectados por ELISA. Concluíram os autores que a presença de larvas de *Toxocara* em vísceras de galinhas pode representar risco de infecção para humanos.

Azizi e colaboradores (2007) infectaram galinhas com 1000 ou 3000 ovos embrionados de *T. cati* e realizaram a eutanásia 3, 7, 14 e 21 dias após a infecção. Avaliaram a recuperação de larvas e fez estudos histopatológicos. Recuperaram

larvas em 2/4 dos frangos inoculados com 1000 larvas, mas não relataram o número de larvas recuperadas após inóculo com 3.000 larvas. O exame macroscópico mostrou hemorragias lineares no fígado e focos hemorrágicos nos pulmões e rins nas galinhas necropsiadas em 3 e 14 dias após a infecção. O exame microscópico mostrou áreas necróticas e hemorrágicas, circundados por infiltrado inflamatório contendo eosinófilos e linfócitos, no fígado os animais sacrificados 14 e 21 dias após a infecção. Miocardite eosinofílica foi observada do 3º ao 21º dia após a infecção. Os autores reforçam a ideia de que a ingestão de vísceras de galinhas cruas ou mal cozidas é risco para infecção com *Toxocara* sp em humanos.

Tentando estabelecer o tempo durante o qual larvas de *Toxocara* podem permanecer viáveis e infectantes em vísceras de galinhas, Oryan, Sadjjadi e Azizi (2010) infectaram galinhas com 1000 ovos embrionados de *T. cati* as quais foram eutanasiadas 240 dias após a infecção. Dos 10 frangos inoculados houve a recuperação de larvas em três, no cérebro. Embora tenham descrito a presença de lesões em todos os órgãos examinados (focos de hemorragia, infiltrado inflamatório), os autores não relatam a observação de larvas nos tecidos examinados.

Observação semelhante à de Oryan, Sadjjadi e Azizi (2010) foram relatadas por Taira, Saitoh e Kapel (2011). Os pesquisadores infectaram frangos com 3000 ovos embrionados de *T. cati* e recolheram as larvas de vísceras entre 1 e 176 dias após a infecção. Observaram que nos primeiros sete dias após a infecção há maior quantidade de larvas no fígado e nos pulmões; a partir de 30 dias a maioria das larvas foram recuperadas do tecido muscular. As larvas recolhidas após digestão trípica das vísceras (músculos) nos dias 175 e 176 após a infecção foram administradas em camundongos (média de 22 ± 6 larvas/animal). Duas semanas depois os camundongos foram eutanasiados para recuperação das larvas na carcaça. A recuperação de larvas em todos os camundongos foi em torno de 50% das larvas administradas. Concluíram que as larvas de *T. cati* persistem por longo período no músculo de galinhas, mantendo a sua infectividade.

Na tentativa de verificar o efeito do resfriamento sobre a viabilidade de larvas de *T. cati* retidas no músculo de galinhas, Taira e colaboradores (2012) infectaram galinhas com 10000 ovos embrionados e realizaram a eutanásia 30 dias após a infecção. O músculo peitoral e músculo da coxa foram removidos, recortados em pequenos fragmentos. O tecido recortado foi separado em porções de 50g e colocados à 4°C por 14 e 28 dias e à -25°C por 12, 24 e 48 horas. Após cada período de conservação o tecido foi digerido, as larvas recuperadas e inoculadas

pela boca em camundongos. Nos camundongos infectados com larvas armazenadas à 4°C até 28 dias houve recuperação das larvas 15 dias após a infecção, demonstrando a infectividade das larvas no tecido refrigerado. Já as larvas colhidas do tecido armazenado à -25°C não foram infectantes para os camundongos, mostrando que a baixa temperatura matou a grande maioria das larvas. Concluem que na carne resfriada de frangos se existirem larvas de *T. cati*, essas podem ter preservadas a sua capacidade de infectar.

A revisão da literatura sobre a infecção de galinhas e outras aves por *Toxocara* mostra que essas aves são hospedeiros paratênicos para as duas espécies mais comuns do parasita (*T. canis* e *T. cati*) e que para o *T. canis* as larvas são encontradas com maior frequência no fígado, sendo mais frequentes no músculo na infecção pelo *T. cati*. Vários experimentos demonstraram que as larvas contidas nas vísceras das aves infectadas tem potencial infectante para mamíferos por longos períodos após a infecção (até seis meses). Há evidências que as larvas permanecem viáveis nos tecidos de galinhas infectadas após refrigeração a 4°C por até trinta dias. É possível que infecção natural de minhocas com ovos de *Toxocara* sp possa ser uma fonte natural de infecção de aves que ingerem os anelídeos como alimento.

1.7 Toxocaríase humana adquirida pela ingestão de carne e vísceras de aves cruas ou mal cozidas

O primeiro relato de possível infecção humana com larvas de ascarídeos ingeridas em vísceras cruas ou mal cozidas foi feito por Lee e colaboradores (1976) que fizeram um inquérito alimentar na Coréia do Sul para investigar o hábito de comer fígado cru de animais domésticos. Investigaram também a presença de larvas em fígados de boi e de porco. Verificaram que foi alta a frequência do hábito de ingerir fígado cru de animais domésticos e encontraram larvas em 11,8% e 6,4% respectivamente em fígados de boi e porcos. As larvas foram identificadas como de *Toxocara vitulorum* (sinonímia: *Neoascaris vitulorum*). Os autores infectaram galinhas com *T. canis*, identificaram larvas nos fígados das galinhas infectadas e demonstraram que essas larvas são infectantes ao produzirem a infecção em camundongos que receberam, pela boca, as larvas recuperadas dos fígados das galinhas infectadas. Embora não se saiba se *T. vitulorum* produz larva migrans em humanos, os autores levantam a hipótese de que o homem pode se infectar com larvas de *Toxocara* sp comendo fígado cru de animais domésticos.

Em 1986 Ito e colaboradores (apud Nagakura et al, 1989), no Japão, descreveram três casos de larva migrans visceral em pacientes que ingeriram carne crua de frango ou fígado bovino cru. Dois anos depois, também no Japão, Shigeno e colaboradores (1988, apud Nagakura et al, 1989) relataram mais dois casos de toxocaríase humana após ingestão de carne crua de galinha ou fígado cru de boi.

Em 1989, Nagakura e colaboradores, em uma carta ao editor do Journal of Infectious Diseases, descreveram, ainda no Japão, mais dois casos de Toxocaríase aguda em dois irmãos que ingeriram fígado cru de galinha e apresentaram, uma semana depois, quadro de larva migrans visceral com eosinofilia acima de 60%. A infecção com *Toxocara* foi confirmada por sorologia (ELISA, imunofluorescência indireta, contra-imunoelectroforese e “imunoblot”). Relataram ainda que três pessoas que comeram junto com os dois irmãos tiveram sintomatologia semelhante, mas não foram submetidos a sorologia.

Toxocaríase em mais de um membro da mesma família, após a ingestão de fígado de frango cru foi relatado no Japão por Morimatsu e colaboradores (2006). Dois adultos de 45 e 71 anos (pai e filho) desenvolveram o quadro clínico de larva migrans confirmado por sorologia. Os autores ao examinarem uma das galinhas do grupo de onde se originou a galinha ingerida pelos pacientes e encontraram 202 larvas de *Toxocara* sp no fígado, caracterizando assim a fonte da infecção.

Caso semelhante aos relatados por Morimatsu e colaboradores (2006) foi descrito por Hoffmeister e colaboradores (2007) em um hospital universitário de Berlim, onde uma mulher de 55 anos deu entrada no hospital apresentando os sintomas de toxocaríase, relatando o consumo de fígado de pato cru duas semanas antes da entrada no hospital.

Um caso relatado de meningite por *T. canis* após ingestão de fígado cru de avestruz foi publicado por Noh e colaboradores (2012) na Coreia do Sul. Era um rapaz, de 17 anos, previamente saudável, apresentando quadro clínico de meningite eosinofílica, confirmado por sorologia, ser causada por *Toxocara canis*. O paciente desenvolveu o quadro de meningite quatro semanas após visitar os pais em uma fazenda de criação de avestruz, vacas e cães. O jovem e seus pais consumiram fígado cru de avestruz. Embora seus pais não apresentassem sintomas clínicos da toxocaríase, possuíam como o jovem, resultados de ELISA positivos para *T. canis* e eosinofilia no leucograma. O irmão do jovem, de 21 anos de idade, que não consumiu o fígado cru de avestruz, mostrou-se soronegativo para *T. canis* e contagem normal de eosinófilos no sangue.

1.8 Toxocaríase humana adquirida pela ingestão de carne e vísceras cruas ou mal cozidas de outros animais hospedeiros paratênicos do *Toxocara* sp.

Existem relatos de toxocaríase em pessoas que consumiram carne e vísceras de origem bovina, suína ou de cordeiro, cruas ou mal cozidas. Stürchler, Weiss e Gassner (1990) descreveram um casal suíço diagnosticados com toxocaríase, causada pela ingestão de fígado de porco cru. Na América do Norte, um homem de 63 anos de idade foi diagnosticado com toxocaríase possivelmente causada pela ingestão de fígado cru de cordeiro (Salem & Schantz, 1992). Um caso de urticária secundária à toxocaríase foi descrita por España e colaboradores (1993), onde o paciente relatou uma prévia história de consumo de carne bovina crua. Em 1999, Aragane e colaboradores relataram que uma larva de *Toxocara* sp foi encontrado em uma biópsia da pele do tornozelo de uma mulher japonesa com 26 anos que tinha uma história de ingestão de fígado bovino cru. Abe e colaboradores (2002) em Fukuoka no Japão, descreveu um caso de miocardite associada à larva migrans visceral devido a *Toxocara canis* horas após o paciente de 25 anos confessar ter consumido várias vezes carne crua, cuja origem não é relatada pelos autores.

Yoshikawa e colaboradores (2008a) publicaram um caso de toxocaríase diagnosticada em um homem de 58 anos no Japão, que poderia estar relacionado ao consumo regular de fígado bovino cru. O mesmo grupo de Yoshikawa e colaboradores (2008b) relataram três adultos da mesma família, que contraíram toxocaríase e tinham em comum o hábito de consumir fatias de fígado bovino cru semanalmente. Os pacientes desenvolveram eosinofilia e várias lesões granulomatosas no fígado e pulmões.

Um estudo epidemiológico realizado na Coreia do Sul tentou avaliar a relação entre toxocaríase e ingestão de carne crua em pacientes com eosinofilia de etiologia desconhecida (Choi et al, 2008). Foram selecionados 120 pacientes com eosinofilia idiopática, sendo 104 soropositivos para *T. canis* e 16 soronegativos. Os pesquisadores investigaram a história recente de comer fígado cru de boi ou de outros animais, ou carne crua de boi ou de outros animais, sangue de qualquer animal e peixe cru, mostraram após análise multivariada, que apenas a ingestão de fígado de boi cru foi significativamente associada com a sorologia positiva para Toxocaríase. O estudo sugere que a ingestão de fígado bovino cru e de outros hospedeiros paratênicos aumenta substancialmente o risco de toxocaríase. Os mesmo autores (Choi et al, 2012), voltaram a pesquisar a transmissão de *T. canis* pela via de ingestão de fígado bovino cru. Foi realizado um estudo transversal com

150 adultos aparentemente saudáveis. Os pacientes foram divididos em dois grupos, um com sorologia positiva para *T. canis* (n=86), e outro com a sorologia negativa (n=64). Os pesquisadores observaram que 79,1% (n=68) dos soropositivos para *T. canis* tiveram uma história recente de ingestão de fígado bovino cru, outros 9,3% ingeriram também fígado cru de outros animais como porcos (n=7), cães (n=3), caprinos (n=2), galinhas (n=2), patos (n=1) e gansos (n=1). O estudo também apontou o convívio com cães sendo mais um dos fatores que aumentam o risco de toxocaríase (25,6% dos soropositivos informaram manter cães em suas residências ou quintais).

Larva migrans visceral (LMV) possivelmente associada à ingestão de minhocas foi publicada por Cianferoni e colaboradores (2006) em Boston, USA. Relatam o caso de uma jovem de 16 anos, apresentando os sintomas de toxocaríase (larva migrans), e descrevendo ingestão (por brincadeira), duas semanas antes do aparecimento dos sintomas, de uma minhoca, em um quintal onde havia cães e filhotes brincando. Os resultados laboratoriais confirmaram a toxocaríase. Embora a paciente negasse a ingestão de carne ou fígado cru ou mal passado, os autores postulam o fato de a paciente ter ingerido uma minhoca, hospedeiro paratênico conhecido do *Toxocara* sp, oriunda de um solo possivelmente contaminado, como a provável causa da toxocaríase. Não descartam a possibilidade de a paciente ter ingerido os ovos de *Toxocara* sp existentes no terreno. Os autores não comentam, mas deve ser considerado o relato da paciente possuir um gato e uma cobaia em sua residência, que podem também ser fonte da contaminação.

Outro caso de LMV possivelmente associada à ingestão de minhocas e lagartixas foi publicado por Yu e colaboradores (2012). Foi relatado um caso de um homem de 21 anos de idade, oriundo de Hanain, na China, região onde a transmissão do *Toxocara* sp no solo é endêmica. O paciente relatou que ingeriu várias minhocas vivas e lagartixas por sugestão de uma bruxa, como um tipo de terapia antidepressiva alternativa, um ano antes da entrada no hospital. O paciente foi diagnosticado com LMV hepática confirmada por sorologia. Os autores apresentam como uma provável fonte de contaminação a ingestão múltipla de minhocas vivas e lagartixas, que tanto servem como hospedeiros paratênicos do *Toxocara* sp, como transportam o solo contaminado.

Conforme a revisão da literatura apresentada nos parágrafos anteriores verifica-se que: (a) a toxocaríase humana também está associada ao consumo de carne e vísceras cruas ou mal cozidas de hospedeiros paratênicos infectados,

incluindo aves, especialmente galinhas e perus; (b) experimentos comprovaram o potencial de transmissão das larvas do *Toxocara* sp contidas em vísceras cruas de galinhas administradas a mamíferos, mesmo se as vísceras são mantidas por longos períodos à baixas temperaturas (4°C); (c) a revisão da literatura (PUBMED) até março de 2013 não evidenciou publicações sobre infecção natural de galinhas pelo *Toxocara*. Por essas razões e devido à alta frequência da coabitação de cães e gatos no meio rural, onde são criadas as galinhas de criação extensiva (denominadas galinhas caipiras), planejamos investigar em uma amostra dessas galinhas a prevalência da infecção com *Toxocara* sp através da pesquisa de anticorpos no soro e pesquisa de larvas no fígado de animais provenientes de abatedouros. Acreditamos que tal investigação poderá fornecer dados sobre a infecção natural das galinhas caipiras e o seu potencial como possível transmissor da toxocaríase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

Avaliar a prevalência da infecção natural com *Toxocara* sp em galinhas caipiras no Espírito Santo através da detecção de anticorpos anti-*Toxocara* sp no soro e o isolamento de larvas nas vísceras de animais de abatedouros desse tipo de ave.

2.2 Objetivos específicos:

- a) Utilizar um teste ELISA com antígeno de secreção e excreção de *Toxocara canis* para pesquisar anticorpos anti-*Toxocara* sp no soro de galinhas de criação extensiva (galinhas caipiras)
- b) Pesquisar larvas do parasita no fígado de galinhas caipiras oriundas de abatedouros não controlados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos.

A manipulação dos animais foi sempre realizada em conformidade com o que determina a Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL), antigo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética, Bioética e Bem Estar Animal da Universidade Vila Velha (CEUA-UVV), conforme parecer consubstanciado nº 219/2012.

3.2 Amostras

Para os ensaios foram utilizados amostras de soros e vísceras de galinhas. Ao todo foram testadas amostras de 177 galinhas distribuídas em grupos conforme a sua origem: criadouros controlados, abatedouros não controlados e criação extensiva em diversas áreas do estado do Espírito Santo, conforme descrição a seguir.

Soros de 20 galinhas de granja controlada que serviram de controle negativo. Nessa granja o padrão de higiene é alto não permitindo uma provável contaminação das galinhas com ovos de parasitas. Essas galinhas tiveram sorologia negativa para *Toxoplasma gondii* parasita que é adquirido pela ingestão de cistos contidos no solo e muito frequente em galinhas caipiras no Espírito Santo (Beltrame et al, 2012).

Soros de 61 galinhas caipiras, originadas de propriedades rurais nos municípios de Colatina, Linhares (Norte do Estado), Domingos Martins e Marechal Floriano (Região Serrana). Essas amostras foram gentilmente cedidas pelo professor Marcus Alexandre Vaillant Beltrame, e já haviam sido utilizadas em um estudo anterior para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* no Estado (Beltrame et al, 2012).

Soros de 21 galinhas caipiras criadas em quintais abertos à entrada de gatos e cães de duas residências localizadas nos município de Vila Velha, ES (bairros São Conrado e Interlagos).

Soros de 28 galinhas caipiras colhidos em um abatedouro não controlado localizado em Itapoã, Vila Velha-ES. Dessas galinhas, além dos soros, foram colhidos os fígados para pesquisa de larvas do *Toxocara* sp.

Soros de 47 galinhas caipiras submetidas à necropsia no Departamento de Patologia, disciplina de Ornitopatologia, do curso de Medicina Veterinária da UVV.

3.3 Coleta do sangue e obtenção dos soros

Os sangues eram colhidos por punção venosa (veias ulnar cutânea ou braquial da asa) ou nos abatedouros, pelo rompimento da jugular, no momento da eutanásia. A punção era realizada com seringa descartável de 3 mL e agulha hipodérmica 13 x 4,5 mm e o sangue colocado em tubos de ensaio sem anticoagulante. Após a coagulação, os soros eram obtidos por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, sendo imediatamente armazenados a -20° C em freezer.

3.4 Obtenção do controle positivo

Para obter um soro controle positivo uma galinha foi infectada quatro vezes com intervalos de 15 dias com 5000 ovos de *Toxocara canis*.

Os ovos do *Toxocara canis* foram obtidos a partir de fêmeas adultas do parasita recuperadas nas fezes de cães e filhotes infectados. As fêmeas foram mantidas em solução de HCl 0,1 M até o momento da dissecação. Os ovos coletados foram transferidos para um frasco com 1% formalina neutra tamponada (Taira et al, 2011). Foram então incubados por seis semanas à temperatura ambiente, até que se completasse a maturação para larvas L3.

Os ovos embrionados foram lavados com solução salina antes na inoculação e administrados por gavagem, utilizando uma sonda gástrica infantil. Foram realizadas sete coletas de sangue venoso aos dias 0, 15, 33, 42, 49, 67 e 132 após a infecção experimental de ovos embrionados com *T.canis*. 132 dias após a primeira inoculação a galinha foi eutanasiada após anestesia com Tiopental intravenoso 2ml/kg, seguido de eletronarcose. O sangue foi colhido por punção venosa e cardíaca. Depois de coagulado, foi centrifugado para obtenção do soro e também armazenado à -20° C.

3.5 Execução do teste imunoenzimático (ELISA) para detecção dos anticorpos anti-*Toxocara* sp.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM. O teste foi baseado na técnica descrita por de Savigny, Voller e Woodruff (1979) e Rubinsk-Elefant e colaboradores (2001) com modificações.

Foram utilizadas diferentes concentrações das amostras, diferentes concentrações do conjugado, bem como foi titulada a concentração ideal de para se efetuar a adsorção dos soros, para padronização do teste.

3.5.1 Obtenção do Antígeno de *Toxocara canis* de excreção e secreção (TES)

O antígeno TES foi obtido através do cultivo de larvas in vitro (TES Lote 296509) pelo Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, e cedido gentilmente à pesquisa pelo professor Dr. Luiz Carlos Valli, Docente do curso de Medicina da Universidade Vila Velha.

3.5.2 Preparo do extrato de *Ascaridia galli*

A adsorção dos soros com os antígenos de *Ascaridia galli* foram realizadas a fim de diminuir a ocorrência de reações cruzadas e remover anticorpos não específicos para *T. canis*. O *Ascaridia galli* é um dos nematóides mais comuns parasitando galinhas caipiras (Permin et al, 1999; Bowman et al, 2006).

Foi macerado 0,6 g de *Ascaridia galli* em graal com água destilada, acrescida de 10 ml de NaOH 0,25 M. Esse material foi homogeneizado em homogeneizador de tecidos tipo Potter por 1 min mantendo o material em tubo de vidro imerso em gelo. O material foi neutralizado com HCl 2 M. Posteriormente, a suspensão gerada foi centrifugada a 2.000 rpm, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman nº 3, e para separação dos lípides, foi acrescido 1/2 do seu volume em éter. Após a dissolução dos lípides no éter e separação das duas fases da solução (éter/tampão) a camada de éter foi retirada e o extrato antigênico, contido na fase aquosa, foi filtrado em membrana de Millipore de 0,45µm. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951) e mostrou concentração de 1,45 mg/ml. O extrato foi aliquotado e conservado a -20°C (Kanamura, Hoshino-Shimizu e Silva 1981).

3.5.3 Sensibilização da placa

Placas de poliestireno com fundo em U (COSTAR 3590, EUA) foram sensibilizadas com 100 µL de antígeno TES diluído 1/800 em PBS 0,01 M, pH 7,2, por 24 horas a 4°C. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes, com intervalo de 5 minutos, com PBS-Tween 20 (0,05%).

3.5.4 Bloqueio da placa

Os sítios livres para ligação de proteína foram bloqueados com 200 µL de solução de leite em pó desnatado (Molico[®], São Paulo, Brasil) diluído em PBS 0,01 M à 2%, pH 7,2. A placa foi incubada por 2 horas à 37°C. Após a incubação, foram efetuados os três ciclos de lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%).

3.5.5 Adsorção do soro com extrato antigênico de *Ascaridia galli* e incubação da placa

Os soros foram testados em duplicata. Os soros foram adsorvidos a uma diluição final de 1/320 com extrato antigênico de *Ascaridia galli* (1,45 mg/ml) diluído à 1/200 em solução de PBS 0,01 M-Leite em pó desnatado (Molico[®]) à 1%, pH 7,2, por 30 minutos. Foi aplicado 100 µL dessa solução em cada orifício na placa. A placa foi então incubada à 37°C por 40 minutos. Após a incubação, foram efetuados os três ciclos de lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%).

3.5.6 Adição do conjugado (anti-IgY marcado com peroxidase)

O conjugado utilizado foi o anticorpo de galinha anti-IgY (IgG), marcado com peroxidase, obtido de coelho (SIGMA, EUA, ref. A9792). Foram aplicados 100 µL do conjugado diluído à 1/5.000 em solução de PBS 0,01M-Leite em pó desnatado (Molico[®]) à 1%, pH 7,2, e incubados por 40 minutos à 37°C. Após a incubação, foram efetuados os três ciclos de lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%).

3.5.7 Adição do Substrato (TMB Cromogen)

Foram adicionados 100 µL de solução cromógena de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB Cromogen, ref. C10001) em cada orifício. O desenvolvimento da cor foi aguardado por 40 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

3.5.8 Adição da solução de interrupção da reação com o cromógeno

A reação foi interrompida após a adição de 100 µL de H₂SO₄ 1M.

3.5.9 Leitura da Densidade Óptica (DO)

A leitura das densidades ópticas foi realizada em comprimento de onda de 450 nm, em leitora automática de microplacas TP-READER (Thermoplate). Os pontos de cortes foram estabelecidos através da média das absorbâncias de 20 soros negativos no teste de ELISA para anticorpos anti-*Toxocara* sp acrescidos de quatro desvios padrão.

3.6 Pesquisa de larvas nos fígados das galinhas originadas de abatedouros e na galinha controle positivo.

A pesquisa de larvas foi realizada no fígado pelo método de esmagamento de pequenos fragmentos do órgão entre duas lâminas de vidro. Cerca de 5 g de cada fígado foram picados em fragmentos de 2 a 3 mm, os quais eram comprimidos entre duas lâminas de vidro de 7 x 5 cm, e examinados ao microscópio com objetiva de 4X e 10X. Na galinha inoculada experimentalmente e usada como controle positivo, a tentativa de recuperação de larvas ocorreu no fígado, rins e cérebro. Esse método foi utilizado por Galvin (1964) em cérebro de galinhas e Flecher (2010) para avaliar larvas em fígado e cérebro de gerbils infectados com *Toxocara canis*. O método permite visualizar facilmente as larvas que podem ser observadas com movimentos mesmo quando estão circundadas por granulomas (Flecher, 2010).

3.7 Estatística

Os dados foram computados no programa Excel e importados para o GraphPad Prism versão 5,0. Foram calculados a média aritmética e o desvio padrão (DP) dos soros das galinhas de granja controlada, consideradas como controle negativo, para estabelecer o ponto de corte da reação. Foi considerado um ponto de corte correspondente a média dos 20 controles negativos acrescida de quatro vezes o desvio padrão da média. As frequências das sorologias foram calculadas com os respectivos intervalos de confiança a 95%.

4 RESULTADOS

Os resultados estão detalhados na Tabela lançada no Apêndice II e resumidos na Figura 1 e na Tabela 1. A média aritmética da DO dos controles negativos foi 0,087, com grande homogeneidade nos resultados (Desvio padrão da média =0,012). Para a determinação do ponto de corte, utilizamos a média aritmética mais quatro desvios padrões, resultando em uma DO igual à 0,135.

O controle positivo foi obtido a partir de única de galinha inoculada experimentalmente com ovos embrionados de *Toxocara canis*. As coletas de sangue ocorreram no dia 0, 15, 33, 42, 49, 67 e 132 dias após o primeiro dia de infecção. As DO medidas em cada soro estão representadas na Figura 1. Foram considerados resultados positivos as amostras das galinhas caipiras com DO igual ou superior à 0,350. Os resultados foram considerados indeterminados quando situados entre o ponto de corte e o valor determinado no controle positivo ($0,135 < DO < 0,350$).

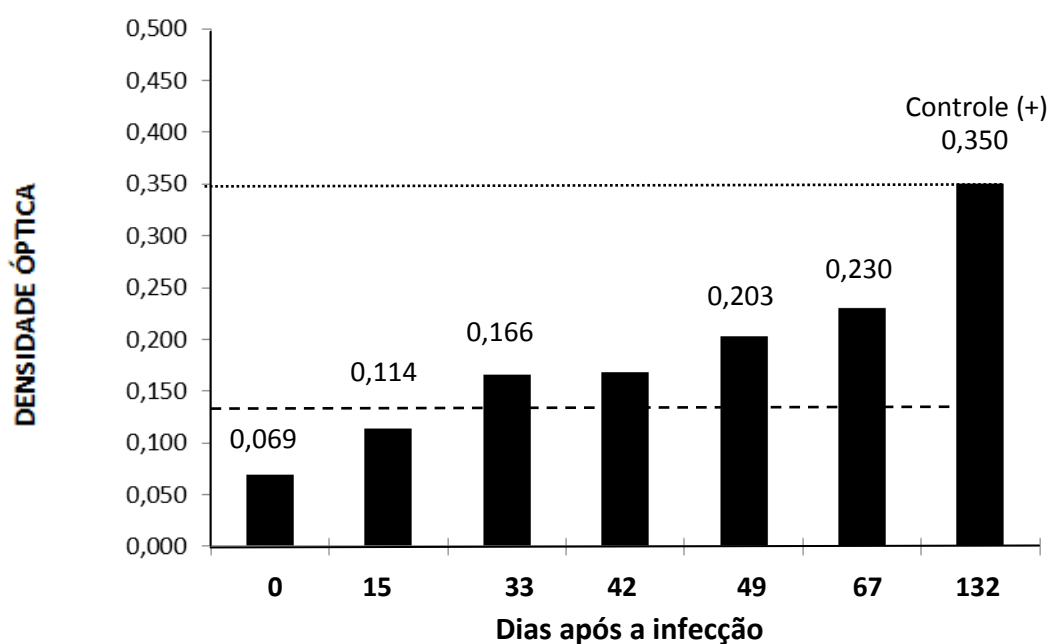


Figura 1. Resultados do ELISA para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* sp em amostras seriadas da galinha controle positivo. A linha tracejada representa o ponto de corte 0,135 DO. A linha pontilhada representa o valor considerado positivo $DO \geq 0,350$ após 132 dias de infecção experimental

Para análise dos resultados foram considerados como mais provavelmente associados á uma infecção com larva persistente do parasita (certamente positivos) os casos positivos com DO igual ou superior a do controle positivo; os casos positivos, com DO intermediária entre o ponto de corte e o valor do controle positivo ($0,135 < DO < 350$) podem ser relacionados a cicatriz sorológica (infecção passada, com eliminação da larva) ou reação cruzada, sendo denominados de indeterminados.

Das 157 amostras analisadas, 20 (12,7%) tiveram resultados de DO superior à 0,350, e 72 (45,8%) tiveram resultados intermediários entre a DO do ponto de corte e a do controle positivo.

Tabela 1. Frequência de resultados de ELISA anti-*Toxocara* sp considerados positivos ($DO \geq 0,350$) e resultados considerados indeterminados ($0,135 < DO < 0,350$) em 157 soros de galinhas de criação extensiva (caipiras) originadas de diversas localidades do Espírito Santo.

GRUPOS	$DO \geq 0,350$ % (IC95%)	$0,135 < DO < 0,350$ % (IC 95%)
Prop. Rurais (n=61)*	14,7 (5,9- 23,5)	63,9 (52,1-75-7)
Quintais VV (n=21)**	4,7(0-13,7)	52,3 (39,8-64,8)
Abat. VV (n=28)***	17,8 (3,7-31,9)	25,0 (9,0-41,0)
Patol. UVV (n=47)****	10,6 (1,8-19,4)	31,9 (18,7-45,1)
Todos (n= 157)	12,7 (7,5-18,2)	45,8 (38,1-53,5)

*Galinhas originadas de Linhares, Colatina, Domingos Martins e Marechal Floriano. ** Quintais de duas residências em Vila Velha. *** Abatedouro em Vila Velha. **** Galinhas necropsiadas no departamento de patologia da Universidade Vila Velha.

A pesquisa de larvas em 28 amostras de fígado originadas de galinhas de abatedouro que abate galinhas caipiras não foi positiva em nenhum animal.

Na galinha inoculada para controle positivo a método do esmagamento mostrou presença de larvas no rim (Figura 3).

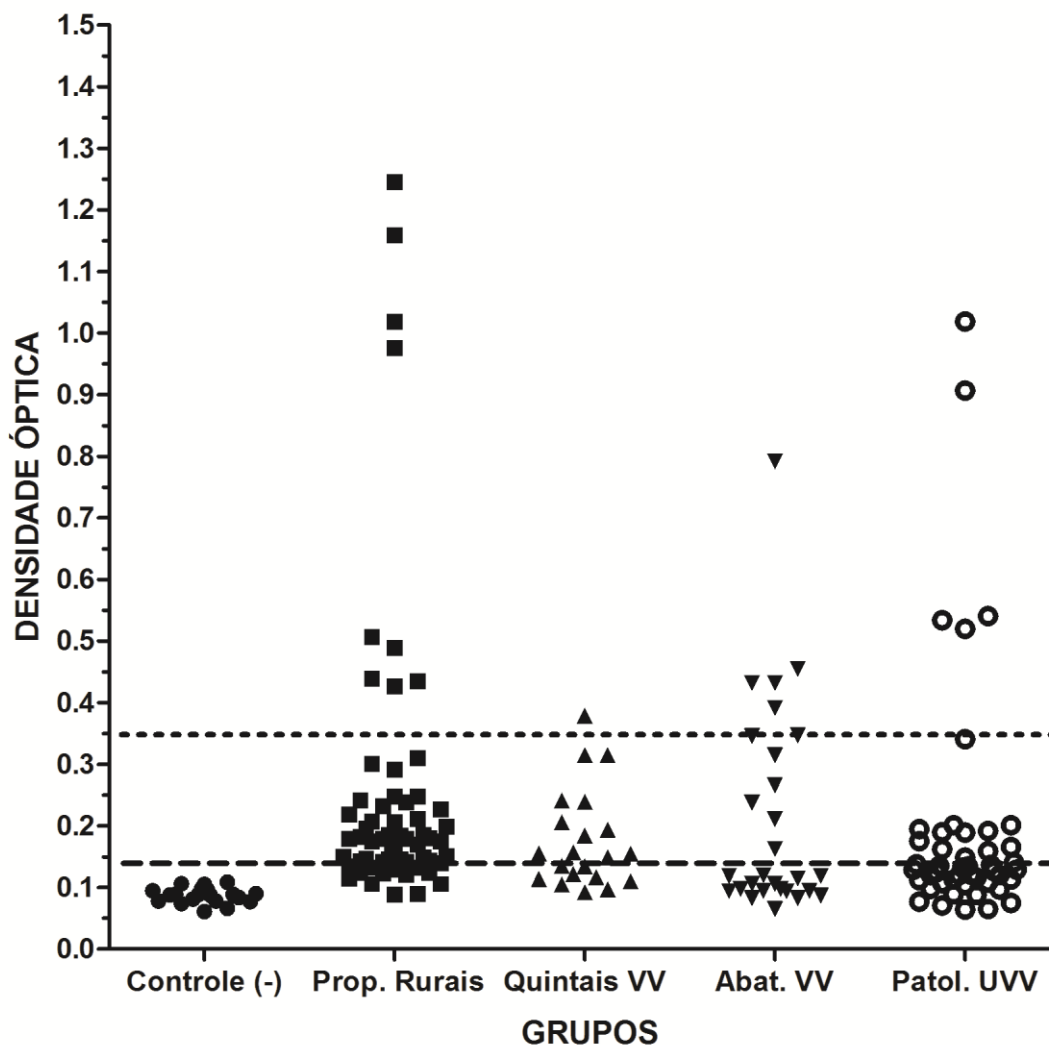


Figura 2. Resultados do ELISA para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* sp em galinhas. A linha tracejada representa o ponto de corte (média + quatro vezes o DP dos controles negativos). A linha pontilhada representa a densidade óptica observada em uma galinha sabidamente infectada com o *Toxocara canis* ($DO=0,350$).

Controle (-): 20 galinhas de granja criadas em ambiente controlado. **Prop. Rurais:** 61 galinhas criadas livres (galinhas caipiras) em pequenas propriedades rurais do Espírito Santo nos municípios de Linhares, Colatina, Domingos Martins e Marechal Floriano. **Quintais VV:** 21 galinhas criadas livremente em quintais de duas residências em Vila Velha-ES (Bairros de São Conrado e Interlagos). **Abat. VV:** 28 galinhas provenientes de abatedouro de Vila Velha, que abate galinhas caipiras provenientes de varias regiões do Estado. **Patol. UVV:** 47 galinhas necropsiadas no Departamento de Patologia Veterinária (disciplinas de Ornitopatologia) da Universidade Vila Velha.

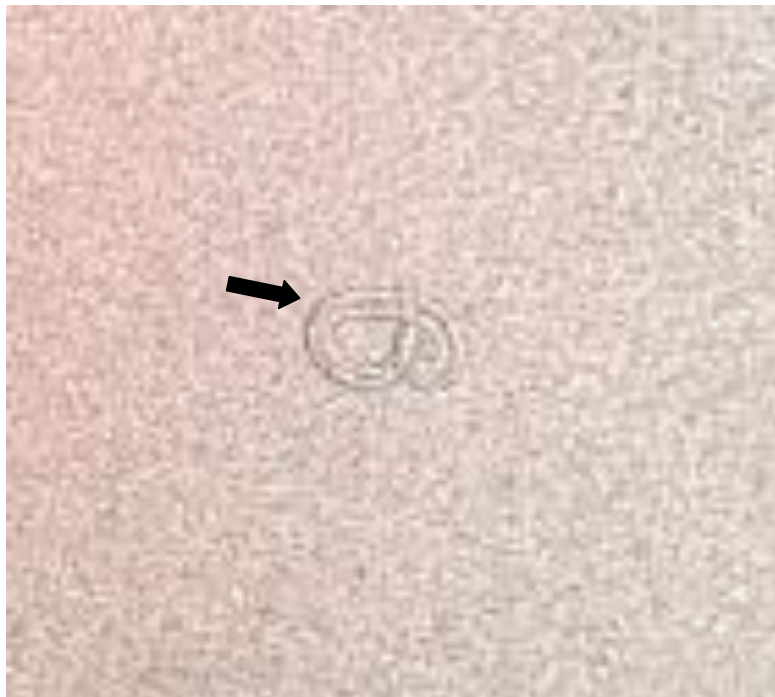


Figura 3. Fotomicrografia de campo microscópico de esmagado de fragmento de rim entre duas lâminas de vidro mostrando a larva de *Toxocara canis* (seta preta) em galinha controle, infectada experimentalmente com ovos embrionados de *Toxocara canis* (132 dias após infecção).

5 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foi empregado como antígeno uma mistura de antígenos de secreção e excreção de larvas de 2º estágio de *Toxocara canis* (TES). Várias publicações afirmam que o teste imunoenzimático (ELISA) utilizando antígenos de secreção e excreção do *Toxocara canis* possui boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da toxocaríase humana (Glickman e Schantz, 1981; Gueglio et al, 1994; Luo, Cheng e Liao, 1999).

Embora vários helmintos apresentem reação cruzada com TES, esta é mais evidente com espécies de *Ascaris* sp (Kennedy et al, 1987), pois são nematódeos da mesma família e filogeneticamente mais próximos. Alguns pesquisadores relatam que a reação cruzada com epítomos de ascarídeos diminui a especificidade do teste, especialmente em populações poliparasitadas (Lynch et al, 1988; Nunes et al, 1999; Romasanta et al, 2003). Por essa razão a adsorção prévia dos soros é recomendada.

Diversos autores utilizaram antígenos de *Ascaris suum* (parasita de suínos) para adsorver soros, em levantamentos epidemiológicos da Toxocaríase humana (Camargo et al, 1992; Moreira-Silva e Pereira, 2000), devido principalmente a similaridade com o *Ascaris lumbricoides* (Kennedy et al, 1987). Entretanto, alguns autores explanam que a pré-adsorção do soro com antígeno de *Ascaris* sp não reduz significativamente os títulos de sorologia para *Toxocara* sp (Thompson et al, 1986). Neste estudo optou-se por realizar a adsorção com extrato de *Ascaridia galli*, por ser este ascarídeo parasita específico das aves, bem como pela alta prevalência deste nematódeo em galinhas, inclusive no Brasil (Cardozo e Yamamura, 2004; Serqueira e Amarante, 2001; Permin et al, 1999). Desse modo, a adsorção prévia dos soros pode ter melhorado a especificidade da reação, embora isso necessite ser mais bem investigado.

Para o controle negativo, animais sem anticorpos anti-*Toxocara* sp, foram escolhidos os soros de galinhas obtidas de granjas controladas. Esses “Frangos de corte”, como também são chamados, são criados intensivamente, sob excelentes condições de higiene, isolados do contato de cães e gatos. Nesses animais geralmente, não se observa parasitismo intestinal por nematóides, uma vez que são instalados bebedouros e comedouros de forma a limitar a contaminação da ração e água com ovos e cistos de parasitas (Serqueira e Amarante, 2001). Esse sistema é caracterizado por apresentar alta densidade de produção, ganho de peso e crescimento corporal rápido, boa conversão alimentar e abate precoce (Cardozo e

Yamamura, 2004). A granja que forneceu as galinhas controle possuía ambientes com um alto padrão de higiene, sendo tomadas medidas profiláticas contra a entrada de outros animais ou insetos. Outra situação que favorece o controle de parasitismo nesses animais é o fato do abate acontecer antes de se completar o período pré-patente da infecção por *Ascaridia* sp, que é de cinco a oito semanas (Serqueira e Amarante, 2001). Um dado que reforça a pouca chance de contaminação dessas galinhas utilizadas como controle é o fato de 50 delas terem sido usadas como controle de infecção com *Toxoplasma gondii* e todas foram negativas (Beltrame et al, 2012): o modo de aquisição é semelhante nas duas parasitoses, pois se faz por ingestão de cistos (*T. gondii*) ou ovos (*Toxocara* sp) contaminando o ambiente.

Uma limitação do estudo foi o número restrito de controles verdadeiramente positivos (apenas uma galinha). Houve, na época em que a pesquisa estava em desenvolvimento, grande dificuldade em conseguir vermes adultos de *Toxocara* sp (fêmeas adultas) para a extração dos ovos, embrionamento e consequente inoculação experimental das galinhas. Só foi possível inocular uma galinha com quatro doses de 5.000 ovos embrionados, em intervalos de 15 dias.

Considerando todas as possíveis falhas e limitações do método empregado, é pouco provável que a prevalência significativa de soropositividade encontrada em nosso estudo seja exclusivamente um artefato de reação cruzada com antígenos de outro nematóide, tendo em vista que 12,7% das galinhas caipiras tiveram uma DO igual ou superior ao controle positivo (0,350), indicando que houve infecção natural de galinhas por *Toxocara* sp e os níveis de anticorpos estão iguais ou acima do controle positivo, que tinha larvas do parasita nos tecidos. É possível que essas aves tenham tido a infecção e ainda albergam as larvas do *Toxocara* sp. No entanto, se considerarmos o ponto de corte 0,135 DO, os resultados positivos sobem para 58,5%, indicando que mais da metade das galinhas entraram em contato com o parasita, ou seja, se infectaram com ovos embrionados viáveis do *Toxocara* sp.

É difícil interpretar os resultados que ficaram acima do ponto de corte e abaixo do valor do controle positivo: seriam infecções com o *Toxocara* sp e com títulos mais baixos ou seriam resultados de reações cruzadas? Essa é a interpretação informada nos kits para diagnóstico de Toxocaríase humana utilizando TES: valores acima dos chamados controles negativos absolutos e abaixo da média de verdadeiros positivos são considerados ou como infecção com títulos baixos ou resultados de reações cruzadas.

Se imaginarmos que na natureza a galinha de criação extensiva está em contato permanente com solos onde podem existir ovos do *Toxocara*, a ave pode ingerir uma pequena quantidade de ovos e adquirir infecção com baixa carga parasitária, podendo se tornar resistente à reinfecção, mantendo títulos baixos de anticorpos contra o parasita.

A existência de animais com DO acima de 0,500 ou mesmo próximos ou acima de 1.0 indica que certamente são animais que apresentam a infecção com larvas persistentes no tecido, possivelmente adquiridas mais recentemente. Não se exclui também a possibilidade de que a presença de outros nematóides intestinais possa funcionar como reforço imunológico, aumentando o título de anticorpos anti-*Toxocara* sp nesses animais. O único controle positivo que utilizamos era uma ave proveniente de granja controlada, sem parasitas intestinais, razão pela qual a DO apresentada por essa ave foi inferior a de muitas das aves das amostras investigadas.

A alta prevalência de anticorpos anti-*Toxocara* sp em galinhas caipiras, especialmente nas provenientes de pequenas propriedades rurais (63,9%), indica que nessas propriedades esses animais estão expostos a ambiente com grande contaminação por ovos do nematóide. De fato na maioria das propriedades era observada a presença de cães e gatos circulando livremente nos ambientes onde as galinhas também circulavam. Assim, de modo semelhante ao que se observa para oocistos do *Toxoplasma gondii* (da Silva et al, 2003), as galinhas são bons animais sentinela para detectar a contaminação de solos com ovos de *Toxocara* sp. Por outro lado, o hábito de fornecer a cães e gatos vísceras cruas de galinhas abatidas na propriedade pode contribuir para a manutenção do ciclo do *Toxocara* sp nesses animais, que podem se contaminar ingerindo as larvas do parasita contidas nas vísceras de galinhas infectadas.

O resultado negativo para a pesquisa de larvas em todos os fígados das galinhas provenientes de um abatedouro não controlado em Itapoã, Vila Velha-ES, indica a possibilidade, nos casos das aves com sorologia positiva, do sistema imunológico ter eliminado as larvas desse órgão. Vários autores descrevem a diminuição do número larvas nas vísceras das galinhas com o tempo (Galvin,1964; Okoshi e Usui, 1967; Agnihotri, Bhatia e Kumar, 1987; Maruyama et al, 1994a; Gargili et al, 1999; Oryan, Sadjjadi e Azizi, 2010; Taira, Saitoh e Kapel, 2011), o que pode justificar a ausência de larvas nos fígados analisados em nosso estudo. Como não foi pesquisada a recuperação de larvas em outras vísceras ou na carcaça, não

foi possível avaliar a presença de larvas em outros órgãos na infecção crônica. Por outro lado utilizamos um método que analisou uma amostra pequena do tecido hepático o que diminui muito a sua sensibilidade. Esse método permite boa visualização de larvas quando elas aparecem, pois em uma galinha infectada no laboratório e sacrificada oito dias depois, as larvas puderam ser facilmente observadas no fígado (dados não mostrados). Uma investigação em galinhas caipiras tomando todo o fígado para a procura das larvas é necessária para melhorar a informação sobre o risco real de ingerir larvas de *Toxocara* sp, possivelmente presentes no fígado cru ou mal passado de galinhas caipiras.

Em conclusão, apesar das possíveis falhas existentes no método sorológico empregado, os nossos resultados mostraram que deve existir a infecção natural de galinhas caipiras com *Toxocara* sp, fato bem indicado pela alta frequência de testes ELISA positivos (58,5%) e DO acima do controle positivo em 12,7% dos animais examinados. Investigações futuras são necessárias para melhorar o desempenho da reação, especialmente para obter ponto de corte mais preciso, com a utilização de um número significativo de galinhas verdadeiramente positivas e utilizar adsorção dos soros com mistura de antígenos de todos os nematóides parasitas de galinhas, para verificar o impacto de reações cruzadas nos resultado do ELISA utilizando antígenos de secreção e excreção do *Toxocara canis*.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que existe infecção natural de galinhas caipiras pelo *Toxocara* no estado do Espírito Santo, fato demonstrado pela alta frequência de resultados positivos nas galinhas examinadas (58,5%) e pelo achado de 12,7% de galinhas com DO acima do valor de soro controle positivo, utilizando teste ELISA com antígenos de secreção e excreção do *Toxocara canis*. As galinhas com DO > ponto de corte e abaixo da DO da ave positiva podem representar animais infectados com baixos títulos de anticorpos ou resultam de reações cruzadas com outros nematóides.

7 REFERÊNCIAS

- Abe K, Shimokawa H, Kubota T, Nawa Y, Takeshita A. Myocarditis associated with visceral larva migrans due to *Toxocara canis*. Intern Med. 2002; 41: 706-708.
- Agnihotri RK, Bhatia BB, Kumar D. Visceral larva migrans. 1. Migratory behavior of *Toxocara canis* larvae in golden hamster and chicken. Indian J Anim Sci. 1987; 57: 853–855.
- Aragane K, Nobuaki A, Tomohiro M, Sugita M, Natsuaki M, Kitada O. Fever, cough and nodules on ankles. Lancet. 1999; 354: 1872.
- Azizi S, Oryan A, Sadjjadi SM, Zibaei M. Histopathologic changes and larval recovery of *Toxocara cati* in experimentally infected chickens. Parasitol Res. 2007; 102: 47-52.
- Bass JL, Mehta KA. Clinically inapparent toxocara infection in children. N Engl J Med. 1983; 308: 723-724.
- Beaver PC, Snyder C H, Carrera G M, Dent JH, Lafferty JW. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases. Pediatrics. 1952; 9: 7-19.
- Beaver, PC. Parasitological reviews. Larva migrans. Exp Parasit. 1956. 5: 587-621.
- Beltrame MA, Pena HF, Ton NC, Lino AJ, Gennari SM, Dubey JP, Pereira FE. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma Gondii* from free-range chickens from Espírito Santo State, southeastern Brazil. Vet Parasitol. 2012; 188: 225-230.
- Bowman D D, Lynn R C, Eberhard M L, Alacara Z. Helmintos. In: Bowman, D.D. Parasitologia Veterinaria de Georgis. 8ª Ed., Manóle, Rio de Janeiro, 2006. p.206-211.
- Camargo ED, Nakamura PM, Vaz AJ, da Silva MV, Chieffi PP, de Melo EO. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1992; 34: 55-60.
- Cardozo SP, Yamamura MH. Parasitas em produção de frangos no sistema de criação tipo colonial/caipira no Brasil. Semina: Ciências Agrárias, 2004; 25: 63-74.
- Carvalho EA, Rocha RL. Toxocariasis: visceral larva migrans in children. J Pediatr (Rio J). 2011; 87: 100-110.

Choi D, Lim JH, Choi DC, Paik SW, Kim SH, Huh S Toxocariasis and ingestion of raw cow liver in patients with eosinophilia. *Korean J Parasitol* 2008; 46: 139–143.

Choi D, Lim JH, Choi DC, et al. Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: a cross-sectional study in healthy adults. *Korean J Parasitol*. 2012; 50: 23–27.

Cianferoni A, Schneider L, Schantz PM, Brown D, Fox LM. Visceral larva migrans associated with earthworm ingestion: clinical evolution in an adolescent patient. *Pediatrics*. 2006; 117: 336-339.

da Silva DS, Bahia-Oliveira LM, Shen SK, Kwok OC, Lehman T, Dubey JP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. *J Parasitol*. 2003; 89: 394-396.

de Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol*. 1979; 32: 284-288.

Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 265-72.

España, A., Serna, M.J., Rubio, M., Redondo, P., Quintanilla, E. Secondary urticaria due to toxocariasis; possibly caused by ingesting raw cattle meat? *J. Investig. Allergol Clin Immunol*. 1993; 3: 51–52.

Fragoso RP, Monteiro MBM; Lemos EM, Pereira FEL. Anti-Toxocara antibodies detected in children attending elementary school in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil: prevalence and associated factors. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2011; 44: 461-466.

Flecher MC. Infecção de gerbils (*Meriones unguiculatus*) com *Toxocara canis*: migração de larvas e estudo morfológico com pesquisa imunohistoquímica de antígenos de larvas nas lesões. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em doenças Infecciosas CCS UFES, 2010.

Galvin TJ. Experimental *Toxocara canis* infections in chickens and pigeons. *J Parasitol*. 1964; 50: 124-127.

Gargili A, Tuzer E, Gulanber A, Toparlak M, Efil I, Keles V, Ulutas M. Experimental visceral larva migrans in chicken with *Toxocara canis*. Turk Vet ve Hayvanc Derg 1999; 23: 431–433.

Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. Epidemiol Rev. 1981; 3: 230-250.

Gueglio B, de Gentile L, Nguyen JM, Achard J, Chabasse D, Marjolet M. Epidemiologic approach to human toxocariasis in western France. Parasitol Res. 1994; 80: 531-536.

Hoffmeister B, Glaeser S, Flick H, Pornschlegel S, Suttorp N, Bergmann F. Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76: 600–602.

Jacob CM, Pastorino AC, Peres BA, Mello EO, Okay Y, Oselka GW. Clinical and laboratorial features of visceral toxocariasis in infancy. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1994; 36: 19-26.

Kanamura HY, Hoshino-Shimizu S, Silva LC. Solubilization of antigen *S. mansoni* adult worms for the passive hemagglutination test. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1981; 23: 92-95.

Kennedy MW, Qureshi F, Haswell-Elkins M, Elkins DB. Homology and heterology between the secreted antigens of the parasitic larval stages of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. Clin Exp Immunol. 1987; 67: 20-30.

Lee KT, Min HK, Chung PR, Chang JK. Studies on the inducing possibility of human visceral larva migrans associated with eating habit of raw liver of domestic animals. J Korean Parasitol. 1976; 14: 51-60.

Lynch NR, Wilkes LK, Hodgen AN, Turner KJ. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. Parasite Immunol., 1988; 10: 323-337.

Luo ZJ, Cheng SW, Liao L. A method for isolation and purification of nematode larvae. J Parasitol. 1999 Jun; 85: 573-574.

Maruyama S, Nino T, Yamamoto K, and Katsube Y. Parasitism of *Toxocara canis* larvae in chickens inoculated with the Ascarid eggs. J Vet Med Sci. 1994a; 56: 139-141.

Maruyama S, Yamamoto K, Katsube Y. Infectivity of *Toxocara canis* larvae from Japanese quails in mice. J Vet Med Sci. 1994b; 56: 399-401.

Moreira-Silva SF, Leão ME, Mendonça HF, Pereira FE. Prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in a random sample of inpatients at a children's hospital in Vitória, Espírito Santo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1998; 40: 259-261.

Moreira-Silva SF, Pereira FE. Intestinal nematodes, *Toxocara* infection, and pyogenic liver abscess in children: a possible association. J Trop Pediatr. 2000 Jun; 46: 167-172.

Moreira-Silva SF, Leite AL, Brito EF, Pereira FE. Nematode infections are risk factors for staphylococcal infection in children. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97: 395-399.

Moreira-Silva SF, Rodrigues MG, Pimenta JL, Gomes CP, Freire LH, Pereira FE. Toxocaríase of the central nervous system: with report of two cases. Rev Soc Bras Med Trop. 2004 ;37:169-174.

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

Musso C, Lemos EM, Tsanaclis AM, Pereira FE. *Toxocara* infection is not associated with viral or bacterial central nervous system infection in children. Neuropediatrics. 2006; 37: 126-129.

Musso C, Castelo JS, Tsanaclis AM, Pereira FE. Prevalence of *Toxocara*-induced liver granulomas, detected by immunohistochemistry, in a series of autopsies at a Children's Reference Hospital in Vitoria, ES, Brazil. Virchows Arch. 2007; 450: 411-417.

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

Nakamura S, Sotoyama T, Hayasaka S, Kameyama Y, Maruyama S, Katsube Y. Parasitism of *Toxocara canis* larvae in Japanese quails by inoculation of the ascarid eggs. J Vet Med Sci. 1991; 53: 865-872.

Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans. Diagnostic, morphology of infective second stage *Toxocara* larvae. J Parasitol. 1956; 42: 349-362.

Noh Y, Hong ST, Yun JY, Park HK, Oh JH, Kim YE, Jeon BS. Meningitis by *Toxocara canis* after ingestion of raw ostrich liver. J Korean Med Sci. 2012; 27: 1105-1108.

Nunes CM, Tundisi RN, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ. Toxocariasis: serological diagnosis by indirect antibody competition ELISA. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1999; 4: 95-100.

Okoshi S, Usui M. Experimental studies on *Toxascaris leonine*: VI. Experimental infection of mice, chickens and earthworms with *Toxascaris leonine*, *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. Jap J vet Sci, 1968; 30: 151-166.

Oryan A, Sadjjadi SM, Azizi S. Longevity of *Toxocara cati* larvae and pathology in tissues of experimentally infected chickens. Korean J Parasitol. 2010; 48: 79-80.

Pahari TK, Sasmal NK. Experimental infection of mice with *Toxocara canis* larvae obtained from Japanese quails. Int J Parasitol. 1990(a); 20: 263-264.

Pahari TK, Sasmal NK. Infection of Japanese quail with *Toxocara canis* larvae and establishment of patent infection in pups. Vet Parasitol. 1990(b); 35: 357-364.

Pahari TK, Sasmal NK. Experimental infection of Japanese quail with *Toxocara canis* larvae through earthworms Vet Parasitol. 1991; 39: 337-340.

Pawlowski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. J Helminthol. 2001; 75: 299-305

Permin A, Bisgaard M, Frandsen F, Pearman M, Kold J, Nansen P. Prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. Br Poult Sci. 1999; 40: 439-443.

Romasanta A, Romero JL, Arias M, Sánchez-Andrade R, López C, Suárez JL, et al. Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays-analysis of

crossreactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol Invest* 2003; 32: 131-142.

Rubinsky-Elefant, G. Jacob CM, Kanashiro, EHY, Peres, BA. Toxocaríase. Ferreira AW, Ávila SLM, ed. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2001; 2ª ed. 323-332.

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

Salem G, Schantz P. Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. *Clin Infect Dis*. 1992; 15: 743–744.

Sasmal NK, Acharya S, Laha R. Larval migration of *Toxocara canis* in piglets and transfer of larvae from infected porcine tissue to mice. *J Helminthol*. 2008; 82: 245-249.

Serqueira TCGO, Amarante AFT. *Parasitologia animal: animais de produção*. 1. ed., Epub: Rio de Janeiro, 2001. p. 83.

Shields JA. Ocular toxocariasis: a review. *Surv Ophthalmol*. 1984; 28: 361-381.

Smirnov AG. Experimental infection of chickens with the larva of *Toxocara canis* and *Ascaris suum*. *Veterinariya (Mosc)*. 1975; 12: 68-70.

Stürchler D, Weiss N, Gassner M. Transmission of toxocariasis. *J Infect Dis*. 1990; 162: 571.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. *Parasitologia Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010; p 306-309.

Taira K, Permin A, Kapel CM. Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. *Parasitol Res*. 2003; 90: 521-523.

Taira K, Saeed I, Permin A, Kapel CM. Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Vet Parasitol*. 2004; 121:115-24.

Taira K, Saitoh Y, Kapel CM. *Toxocara cati* larvae persist and retain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens. *Vet Parasitol*. 2011; 180: 287-291.

Taira K, Saitoh Y, Okada N, Sugiyama H, Kapel CM. Tolerance to low temperatures of *Toxocara cati* larvae in chicken muscle tissue. *Vet Parasitol.* 2012; 189: 383-386.

Thompson DE, Bundy DA, Cooper ES, Schantz PM. Epidemiological characteristics of *Toxocara canis* zoonotic infection of children in a Caribbean community. *Bull World Health Organ.* 1986; 64: 283-290.

Tsvetaeva NP, Sosipatrova LA, Smirnov AG. Pathomorphologic changes in chicks infected with *Toxocara canis*. *Veterinariya.(Mosc).* 1979; 10: 75-77.

Tuzer E, Toparlak M, Gargl A, Gulanber A, Keles V, Efil I, Esatgil MU. Visceral Larva Migrans in mice caused by eating *Toxocara canis* infected chick livers. *Turk Veterinerlik ve Hayvanclık Dergisi.* 2002; 26: 293-297.

Yoshikawa M., Nishiofuku M., Moriya K, Ouji Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Akao N. Viscera Toxocariasis from regular consumption of raw cow liver. *Intern Med.* 2008(a); 47: 1289-1290.

Yoshikawa M., Nishiofuku M., Moriya K, Ouji Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Nakamura T, Maruyama H, Akao N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. *Parasitol Int.* 2008(b); 57: 525-529.

Yu T, Zhao LN, Fan MJ, Wu H, Chen QK. Visceral larva migrans associated with earthworm and gecko ingestion: a case report. *J Med Case Rep.* 2012; 6: 210.

Urquhart GM, Armour J, Ducan JL, Dunn AM, Jennings FW. *Parasitologia Veterinária.* 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1998; 273 p.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Distribuição da frequência de galinhas com resultados verdadeiramente positivos e entre o ponto de corte e a DO da galinha controle positivo para anticorpos anti-*Toxocara* sp através do teste de ELISA, segundo o município de procedência no Estado do Espírito Santo.

Município	n	ELISA	
		DO \geq 0,350 n (%)	0,135 < DO < 0,350 n (%)
Colatina	9	0 (0%)	6 (66,7%)
Domingos Martins	4	3 (75,0%)	1 (25,0%)
Linhares	42	6 (14,3%)	29 (69,0%)
Marechal Floriano	6	0 (0%)	2 (33,4%)
TOTAL	04	61	9 (14,7%)

n = número de galinhas examinadas.

APÊNDICE II

Resultados da pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* sp através do teste de ELISA
segundo o município de procedência no Estado do Espírito Santo.

MUNICÍPIO	Identificação da galinha	DO ELISA
COLATINA	326	0,144
	335	0,242
	337	0,227
	338	0,106
	341	0,090
	343	0,310
	344	0,133
	345	0,180
	348	0,147
	349	0,152
DOMINGOS MARTINS	95	0,440*
	96	0,976*
	98	0,212
	99	1,159*
	352	0,196
	355	0,186
	357	0,207
	358	0,183
	361	0,170
	362	0,135
	364	0,142
	364	0,180
	365	0,163
	366	0,233
	367	0,168
368	0,143	
LINHARES	371	0,239
	372	0,146
	373	0,151
	374	0,208
	375	0,140
	375	0,125
	376	0,248
	377	0,181
	379	0,150
	382	0,115
	383	0,186
	384	0,427*
	385	0,436*
	386	0,507*
	388	0,248
	389	0,199
	390	0,219
391	0,185	
394	1,019*	
398	0,175	

	401	0,180	
	402	0,142	
	403	1,246*	
	404	0,122	
	405	0,124	
	406	0,125	
	407	0,146	
	408	0,176	
	410	0,490*	
<hr/>			
MARECHAL FLORIANO	70	0,089	
	71	0,301	
	73	0,133	
	82	0,292	
	83	0,130	
	88	0,106	
<hr/>			
VILA VELHA Quintais	01	0,315	
	02	0,122	
	03	0,135	
	04	0,206	
	<i>São Conrado</i>	05	0,097
		06	0,092
		07	0,134
		18	0,110
		19	0,149
		20	0,155
	21	0,194	
	22	0,157	
<i>Interlagos</i>	23	0,114	
	24	0,184	
	25	0,379*	
	26	0,117	
	27	0,155	
	28	0,105	
	29	0,315	
	30	0,239	
	31	0,241	
<hr/>			
VILA VELHA Abatedouro	43	0,392*	
	44	0,106	
	45	0,455*	
	46	0,211	
	<i>Itapoã</i>	47	0,094
		48	0,347
		49	0,083
		50	0,119
		51	0,083
		52	0,120
		53	0,119
		54	0,095
		55	0,095
		56	0,432*
		57	0,346
		58	0,065
	59	0,098	
	60	0,163	
	61	0,315	
	62	0,792*	

	63	0,266
	64	0,098
	65	0,106
	66	0,432*
	67	0,087
	68	0,094
	69	0,115
	70	0,238
<hr/>		
VILA VELHA	A	0,520*
Patologia UVV	B	0,077
	C	0,097
	D	0,104
	E	0,075
<i>Bairros diversos</i>	F	0,341
	G	0,071
	H	1,019*
	32	0,149
	33	0,137
	34	0,121
	35	0,120
	36	0,534*
	37	0,192
	38	0,175
	39	0,120
	40	0,162
	41	0,201
	42	0,541*
	71	0,129
	72	0,135
	73	0,201
	74	0,195
	75	0,132
	76	0,166
	77	0,125
	78	0,120
	79	0,108
	80	0,116
	81	0,112
	82	0,127
	83	0,190
	84	0,129
	86	0,159
	87	0,141
	88	0,134
	89	0,138
	90	0,113
	91	0,107
	92	0,189
	93	0,113
	8(1)	0,064
	9(2)	0,088
	10(3)	0,089
	11(4)	0,065
	12(5)	0,098
	13(6)	0,907*

* DO \geq 0,350