

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Antígeno TES recombinante: uma alternativa ao diagnóstico da
toxocaríase humana**

Carolina Georg Magalhães

Pelotas, 2014

Carolina Georg Magalhães

**Antígeno TES recombinante: uma alternativa ao diagnóstico da
toxocaríase humana**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição
Orientador de estágio: Prof^a. Dra. Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M188a Magalhães, Carolina Georg

Antígeno TES recombinante : uma alternativa ao diagnóstico da toxocaríase humana / Carolina Georg Magalhães. – 47f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Fabricio Rochedo Conceição.

1. Biotecnologia. 2. *Toxocara canis*. 3. Imunodiagnóstico. 4. *Escherichia coli*. 5. rTES-30. 6. rTES-120 I. Conceição, Fabricio Rochedo. II. Título.

CDD: 616.0792

Carolina Georg Magalhães

Antígeno TES recombinante: uma alternativa ao diagnóstico da toxocaríase humana

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28/11/2014

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fábio Leivas Leite
Doutor em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin

Dr. Marcelo Mendonça
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Michele Pepe Cerqueira
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus pais,
meus maiores apoiadores.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela oportunidade de realizar um curso de graduação de qualidade, do qual me orgulho de ter feito parte;

Aos meus pais, Claudio e Márcia, por todo amor, compreensão, amizade, paciência e por sempre acreditarem em mim, mais do que eu mesma. Este apoio e suporte foram fundamentais. Não tenho palavras pra expressar o meu amor por vocês;

Ao meu irmão Eduardo, por ter torcido por mim, por estar sempre me ajudando e me motivando, por ter compreendido minha ausência e compartilhado comigo minhas alegrias. Te amo;

À minha família, pela preocupação, incentivo, amor, paciência, conselhos, apoio e por sempre estarem presentes na minha vida. Vocês são meu porto seguro, amo todos;

Ao meu orientador, professor e amigo Fabricio Conceição, por ter aberto as portas do seu laboratório logo no primeiro ano da minha graduação e ter me dado a oportunidade de fazer parte da sua equipe. Por sempre estar presente em todos os momentos da minha formação, pelos conselhos, confiança, motivação, ensinamentos e por ser um exemplo de pessoa e de profissional;

Ao meu co-orientador de coração professor Fábio Leivas Leite, por ter me incluído como agregada no seu laboratório, pelos conselhos, ensinamentos, e por todas as cervejas produzidas e degustadas;

Aos colegas do laboratório de imunologia aplicada, pela troca de ensinamentos, por toda ajuda e preocupação, pelo carinho, amizade, companheirismo, vocês foram muito importantes no meu crescimento. Só tenho a agradecer o incentivo e motivação, em especial das minhas queridas amigas e companheiras de laboratório Bilica Diaz, Michele Pepe e Paula Finger.

Aos colegas do laboratório de microbiologia por terem me acolhido como integrante do grupo, pela troca de conhecimento, por toda amizade, todas as festinhas e rodas de chimarrão.

Aos colegas do laboratório de imunologia celular e molecular da PUCRS, onde eu fiz meu estágio final, por toda confiança, apoio e

companheirismo. Principalmente a professora Cristina, minha orientadora de estágio, pela oportunidade, pelos ensinamentos e por ter me apresentado o mundo da imunologia tumoral;

À Guita Rubinsky-Elefant e ao William Roldán do laboratório de soropidemiologia e imunobiologia do IMT-USP por todo ensinamento, troca de experiências e conhecimentos, carinho e amizade;

Às amigas Fernanda Rodrigues, Fernanda Valiati e Mariana Brustchin por serem grandes presentes que a graduação me deu, pelas horas de discussão nos seminários, sempre recompensadas nas mesas de bar e pela amizade gigante que construímos. Amo vocês;

A toda a turma atbiotec2013, por ser a melhor turma que eu poderia ter. Por todos os churrálcóois, grupos de estudos, reflexões filosóficas e aquelas nem tanto, e todo amor que nos fez tão unidos. Principalmente aos remanescentes: Arthur Silva, Drielly Braite, Júlia Sallaberry, Hugo Furtado, Renan Piraine e Rodrigo Schuch vocês fizeram a minha volta a Pelotas muito mais feliz;

A turma atbiotec2014 por ter me acolhido de braços abertos e por ser um grande time. Por todo carinho, companheirismo, pelas brigas e discussões produtivas e pelas cervejas destampadas pra amenizar tudo isso;

A todos os amigos que fiz em Portugal, por terem dividido comigo o melhor ano de nossas vidas, por todo crescimento, aprendizado, amizade, pela ajuda nos momentos de dificuldades e pelas comemorações sem fins nos momentos felizes;

A todos os meus amigos queridos que a vida me deu, pelas festas, risadas, amizade, parceria, conselhos, paciência, passeios, ensaios, primeiros lugares, incentivo. Vocês são demais;

Aos membros da banca, Michele Pepe, Marcelo Mendonça e prof. Fábio Leivas Leite por terem prontamente aceitado o convite, pelos ensinamentos e por serem exemplos de profissionais;

Aos demais colegas, funcionários e professores do Núcleo de Biotecnologia pela boa convivência, amizade e aprendizado.

Muito Obrigada!!!

Resumo

MAGALHÃES, Carolina Georg. **Antígeno TES recombinante: uma alternativa ao diagnóstico da toxocaríase humana.** 2014. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

A toxocaríase humana é uma doença negligenciada, de distribuição global e que apresenta grandes prejuízos à saúde pública. É caracterizada pela migração das larvas do *Toxocara* spp. em diferentes tecidos do hospedeiro. A infecção ocorre pela ingestão acidental de ovos embrionados ou larvas, que ocasiona nos seres humanos uma diversidade de sintomas clínicos. O diagnóstico padrão atual é o teste ELISA, utilizando o antígeno de excreção e secreção de *T. canis* (TES), porém, a obtenção do TES é laboriosa, de capacidade limitada, demanda tempo e observa-se a reação cruzada com outras infecções parasitárias. Com isso, no presente trabalho, foram produzidas de forma recombinante em *Escherichia coli* duas das principais proteínas componentes do antígeno TES, proteína TES-30 e TES-120, com o objetivo de desenvolver um teste diagnóstico alternativo para a toxocaríase. Genes sintéticos que codificam estas proteínas foram desenhados e clonados no vetor de expressão pAE. Os clones recombinantes pAE/*tes-30* e pAE/*tes-120* foram cultivados em meio LB e a expressão dos antígenos foi induzida por 3h com 0,5 mM de IPTG. As proteínas recombinantes foram solubilizadas em tampão contendo uréia 8 M, purificadas por cromatografia de afinidade, analisadas em SDS-PAGE e confirmadas por *Western blotting*. Esses antígenos recombinantes foram testados em ELISA indireto, de forma isolada e associados, com soros humanos e conjugado anti-IgG humana para análise de sensibilidade e especificidade. As proteínas apresentaram peso molecular de aproximadamente 25 kDa correspondente a rTES-30, e entre 25 kDa e 35 kDa referente a rTES-120. No ELISA indireto, os antígenos rTES-30 e rTES-120 resultaram em valores de especificidade entre 95 e 100% e sensibilidade entre 22,5 e 50%, sendo o antígeno rTES-120, aquele que apresentou melhor resultado. Estes resultados demonstram que as proteínas rTES-30 e rTES-120 foram reconhecidas por anticorpos anti-*T. canis*, indicando potencial para o aperfeiçoamento desses antígenos e utilização como uma alternativa ao teste diagnóstico atual da toxocaríase.

Palavras-chave: *Toxocara canis*, rTES-30, rTES-120, *Escherichia coli*.

Abstract

MAGALHÃES, Carolina Georg. **TES recombinant antigen: an alternative to human toxocariasis's diagnosis.** 2014. 47f. Final Project (Biotechnology Undergraduate Program) - Bachelor of Biotechnology, Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2014.

Human toxocariasis is a neglected disease, which has global distribution and causes extensive damage to public health. It is characterized by the migration of *Toxocara* spp.' larvae in different host tissues. Infection occurs by accidental ingestion of embryonated eggs or larvae, which causes in humans a variety of clinical symptoms. The current standard diagnosis is the ELISA test using the antigen excretion and secretion of *T. canis* (TES), however, obtaining the TES is laborious, time-limited capacity takes time and observed the cross-reaction with other parasitic infections. Thus, in this work, were produced in *Escherichia coli* two of the main components of the protein antigen TES, TES-30 and TES-120, with the goal of developing an alternative diagnostic test for toxocariasis. Synthetic genes encoding these proteins have been designed and cloned into the expression vector pAE. Recombinant clones pAE/*tes-30* and pAE/*tes-120* were cultivated in LB medium and expression of the antigens was induced for 3 h with 0.5 mM IPTG. Recombinant proteins were solubilized in buffer containing urea 8 M, purified by affinity chromatography, analyzed by SDS-PAGE and confirmed by *Western blotting*. These recombinant antigens, alone and associated, were tested in indirect ELISA with human sera and anti-human IgG conjugated to analysis of sensitivity and specificity. These proteins had a molecular weight of approximately 25 kDa corresponding to rTES-30, and between 25 kDa and 35 kDa regarding rTES-120. In indirect ELISA, the rTES-30 and rTES-120 antigens resulted in values of specificity between 95 and 100% and sensitivity between 22.5 and 50%, being the antigen rTES-120, the one that showed the best result. These results demonstrate that the rTES-30 and rTES-120 proteins were recognized by anti-*T. canis*, indicating potential for improvement and use of these antigens as an alternative to current diagnostic test of toxocariasis.

Key words: *Toxocara canis*, rTES-30, rTES-120, *Escherichia coli*

Lista de Figuras

Figura 1 – (A) Avaliação da expressão das proteínas rTES-30 e rTES-120. (B) Caracterização das proteínas rTES-30 e rTES-120 31

Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Valores de sensibilidade, especificidade e reatividade cruzada de soros de pacientes com outras parasitoses em ELISA com os antígenos rTES-30, rTES-120 e rTES-30 + rTES-120 utilizando a média mais três desvios padrões como ponto de corte..... 33
- Tabela 2 - Valores de especificidade incluindo reatividade cruzada de soros de pacientes com outras parasitoses em ELISA com os antígenos rTES-30, rTES-120 e rTES-30 + rTES-120 utilizando a média mais três desvios padrões como ponto de corte. 34
- Tabela 3 - Valores de sensibilidade e especificidade em ELISA com os antígenos rTES-30, rTES-120 e rTES-30 + rTES-120 de acordo com os melhores pontos de corte pela análise ROC..... 35

Lista de Abreviaturas

BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria-Bertani
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos contendo 0,05% de Tween 20
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
IMT-SP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sódio
TES	Antígeno de secreção e excreção de <i>Toxocara</i> spp.
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

1	Introdução	14
2	Revisão de literatura	15
2.1	<i>Toxocara</i> spp.	15
2.2	Toxocaríase	16
2.2.1	Hospedeiros	17
2.2.1.1	Hospedeiros definitivos - cães	17
2.2.1.2	Hospedeiros paratênicos humanos	17
2.2.2	Epidemiologia	18
2.2.3	Quadro Clínico	20
2.2.3.1	Larva <i>migrans</i> visceral (LMV) / toxocaríase visceral	20
2.2.3.2	Larva <i>migrans</i> ocular (LMO) / toxocaríase ocular	21
2.2.3.3	Toxocaríase oculta ou comum (TC)	21
2.2.3.4	Neurotoxocaríase (NT)	21
2.2.3.5	<i>Toxocara canis</i> associado a outras manifestações clínicas	22
2.2.4	Diagnóstico	22
3	Objetivos	25
3.1	Objetivo Geral	25
3.2	Objetivos Específicos	25
4	Materiais e Métodos	26
4.1	Genes sintéticos	26
4.2	Clonagem dos genes sintéticos	26
4.3	Expressão e caracterização das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	27
4.4	Antigenicidade das proteínas recombinantes por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) Indireto	29
4.4.1.	Soros de humanos	29
4.4.2	ELISA indireto	29
5	Resultados	31
6	Discussão	36
7	Considerações Finais	38
	Referências	39

1 Introdução

Este trabalho foi desenvolvido em parte no Laboratório de Imunologia Aplicada localizado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas em que as principais linhas de pesquisa envolvem o desenvolvimento de kits diagnósticos e vacinas para diferentes doenças, principalmente no âmbito veterinário, a produção de anticorpos monoclonais e o estudo e avaliação de probióticos. Outra parte desse projeto foi realizada no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, o qual possui uma ampla soroteca com soros de pacientes com toxocaríase confirmados pelo teste diagnóstico padrão, sintomatologia clínica e dados epidemiológicos. Com isso, este trabalho de conclusão de curso propõe o desenvolvimento de um kit de diagnóstico para toxocaríase humana utilizando antígenos recombinantes de *Toxocara canis* produzidos em *Escherichia coli*.

Toxocaríase humana é uma zoonose parasitária causada pela infecção com larvas de *Toxocara* spp., capaz de causar diversos sintomas clínicos em humanos. É uma doença negligenciada, mundialmente distribuída e que infecta principalmente crianças de populações socioeconômicas desfavoráveis. A alta prevalência da doença no mundo e no Brasil, somada a dificuldade no diagnóstico da infecção tem mostrado a necessidade atual de pesquisas e de novas estratégias para o tratamento, diagnóstico e controle da toxocaríase.

2 Revisão de literatura

2.1 *Toxocara* spp.

O gênero *Toxocara* pertence ao filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Ascaridida, família Anisakidae e compreende mais de 21 espécies (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 2002), sendo apenas duas, *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, reconhecidas como agentes causadores de doenças em humanos. Os parasitos adultos de ambas as espécies parasitam o intestino delgado de seus hospedeiros definitivos, caninos e felinos, respectivamente (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013).

Embora haja evidências de que os seres humanos possam ser infectados por larvas de *T. cati*, também causando as síndromes larva *migrans* visceral (LMV) e larva *migrans* ocular (LMO) (FISHER, 2003), acredita-se que o *T. canis* seja o principal patógeno relacionado a toxocaríase. Esse fato se deve a esta última espécie apresentar características peculiares de ciclo biológico e padrão de migração larvária que a caracterizam como o agente mais frequentemente implicado na etiologia da toxocaríase (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013).

A fêmea adulta do *T. canis* mede de 6 a 18 cm, e o macho de 4 a 10 cm. O dimorfismo sexual é nítido, sendo que os machos apresentam a extremidade posterior recurvada no sentido ventral. Observam-se asas cefálicas estreitas na

extremidade anterior, as quais são responsáveis pela distinção entre as espécies de *T. canis* e *T. cati* (ABE-JACOB & OSELKA, 1991).

Os parasitos adultos vivem em média quatro meses e, por volta dos seis meses, quase todos são eliminados de forma espontânea pelo hospedeiro (CARVALHO & ROCHA, 2011). A fêmea do *T. canis* produz até 200 mil ovos/dia (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981; CARVALHO & ROCHA, 2011) sendo estes ovos resistentes a fatores hostis, podendo permanecer viáveis por um período prolongado no solo (ABE-JACOB & OSELKA, 1991). A princípio, os ovos eliminados nas fezes não são embrionados, ou seja, não são infectantes, e para que haja o embrionamento, são necessárias condições adequadas de umidade e temperatura, sendo que com isso, cerca de 85% dos ovos se tornam infectantes no período de 2 a 5 semanas (CARVALHO & ROCHA, 2011). Assim, a defecação de cães em praças e locais públicos contribui para a contaminação ambiental com ovos de *Toxocara* spp., o que favorece a transmissão zoonótica (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981; CARVALHO & ROCHA, 2011).

2.2 Toxocaríase

Toxocaríase humana é uma zoonose parasitária causada pela infecção com larvas de *Toxocara* spp. principalmente pela espécie *T. canis*, e em menor proporção, pela *T. cati*. Manifesta-se nos seres humanos sob vários sintomas clínicos, os quais incluem a larva *migrans* visceral (LMV), larva *migrans* ocular (LMO), neurotoxocaríase (NT) e toxocaríase oculta ou comum (MACPHERSON, 2013).

A infecção humana ocorre pela ingestão acidental de ovos embrionados ou larvas, permanecendo em sua grande maioria de forma assintomática e sem ser identificada, uma vez que os testes de diagnóstico são caros e necessitam de testes sorológicos, moleculares e/ou de imagem, que podem não ser acessíveis ou disponíveis. O tratamento em humanos varia de acordo com os sintomas e localização das larvas, sendo possível a administração de anti-

helmínticos isoladamente ou em conjunto com corticosteróides anti-inflamatórios (MACPHERSON, 2013).

É uma doença negligenciada, de grandes prejuízos à saúde pública, com distribuição cosmopolita, sendo prevalente tanto em países de clima tropical subdesenvolvidos e desenvolvidos, e infectando principalmente crianças de populações socioeconômicas desfavoráveis, onde o tratamento e controle de cães é limitado (TORGERSON & MACPHERSON, 2011).

2.2.1 Hospedeiros

2.2.1.1 Hospedeiros definitivos - cães

O parasito *T. canis* é transmitido predominantemente entre canídeos (cães, raposas, lobos guará, zorro) através de uma grande variedade de rotas, as quais incluem a transmissão vertical, trans-placentária e/ou trans-mamária (lactogênica), bem como a transmissão horizontal através da ingestão de ovos embrionados do ambiente ou ingestão de larvas presentes em hospedeiros paratênicos vertebrados e/ou invertebrados (OVERGAAUW & VAN KNAPEN, 2000; MACPHERSON, 2013).

Os filhotes são infectados no útero pelas larvas somáticas de *T. canis* da mãe a partir do 42º dia de gestação (LLOYD, 1983; MACPHERSON, 2013). Uma vez infectados, os filhotes liberam milhares de ovos por dia no ambiente, dependendo da intensidade da infecção por *T. canis* e do estado imunológico do hospedeiro (GLICKMAN, 1981).

Em espécies hospedeiras definitivas, o *Toxocara* spp. não costuma causar alterações patológicas, embora uma intensa infecção via trans-placentária em cães possa resultar em uma proeminência na região abdominal, déficit de crescimento e, em alguns casos, morte (LLOYD & MORGAN, 2011; OVERGAAUW & VAN KNAPEN, 2013; MACPHERSON, 2013).

2.2.1.2 Hospedeiros paratênicos humanos

A toxocaríase humana possui parasitismo exclusivamente larval, já que parasitos adultos não estão presentes no trato digestivo humano, exceto em algumas ocasiões onde há presença do parasito adulto na luz intestinal pela ingestão de larvas de quinto estágio (L5) que são eliminadas pelas fezes de filhotes de cães com hiperinfecção (EBERHARD & ALFANO, 1998).

Os humanos são suscetíveis à infecção pela ingestão de ovos embrionados contendo larvas de *T. canis* no estágio L3 ou de larvas presentes em vísceras cruas ou mal cozidas de hospedeiros paratênicos (contaminação de origem alimentar) (DUTRA *et al.*, 2013). Essas larvas de *T. canis* ingeridas acidentalmente penetram a parede intestinal e são transportadas pelo sistema circulatório, através da via hepática, para vários órgãos (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981) onde permanecem infectantes por pelo menos sete anos (STRUBE *et al.*, 2013; MACPHERSON, 2013). Embora as larvas não sofram qualquer desenvolvimento no hospedeiro paratênico, elas podem causar reações imunológicas locais (FONG & LAU, 2004). Durante sua migração somática através dos órgãos, as larvas liberam glicoproteínas imunogênicas conhecidas como antígenos de excreção e secreção de *Toxocara* spp. (TES). É provável que a liberação de grandes quantidades desse antígeno seja uma estratégia das larvas para evadir o sistema imunológico do hospedeiro que preferencialmente monta uma resposta imunológica contra este antígeno (GEMS & MAIZELS, 1996; FONG & LAU, 2004).

2.2.2 Epidemiologia

Muitos fatores biológicos inerentes ao ciclo de vida do parasita, como a possibilidade de transmissão vertical, que permite o início precoce da produção de ovos em jovens hospedeiros definitivos, a sobrevivência prolongada de ovos no meio ambiente e a diversidade das suas espécies de hospedeiros, facilitam a perpetuação do *Toxocara* spp., tornando-o um dos parasitas causadores de zoonoses mais comuns e prevalentes no mundo (MACPHERSON, 2013).

A prevalência global de *Toxocara* spp. em seres humanos é influenciada por uma série de variáveis relacionadas, envolvendo características

populacionais, ambientais, culturais socioeconômicos e geográficas (MACPHERSON, 2013). Em nível individual, a diferença de resposta à infecção é influenciada pela imunidade, pela genética, pela idade, co-infecção, sexo, nutrição e comportamento dos hospedeiros (VINEY & GRAHAM, 2013). Esses fatores, somados ao aumento da população humana, à migração global para os grandes centros urbanos e às interações cada vez mais próximas entre humanos e hospedeiros definitivos sugerem que a toxocaríase vem se tornando um alarmante problema de saúde pública para a maioria da população mundial (MACPHERSON, 2013).

Fatores de transmissão e de risco variam nas diferentes regiões do mundo. Problemas como a pobreza, baixa escolaridade, falta de saneamento e alojamento de populações em locais impróprios propiciam a geração de ambientes altamente contaminados que, em clima tropical, proporcionam condições ótimas de transmissão, principalmente quando associadas à falta de higiene (DUNSMORE *et al.*, 1984; OVERGAAUW, 1997; WON *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010).

No Brasil, diferentes estudos epidemiológicos revelam que a soropositividade para *Toxocara* spp. varia de 3,7 a 40,0% (CHIEFFI *et al.*, 2009; SCHOENARDIE *et al.*, 2013) e, em algumas áreas, chega a 51,6%, em crianças de 1 a 12 anos de idade (COLLI *et al.*, 2010; SCHOENARDIE *et al.*, 2013). Essa alta soroprevalência em crianças é justificada por apresentarem comportamento de geofagia (comer terra), onicofagia (roer unhas) e colocarem objetos na boca. Pela falta de higiene, e pelo estreito contato com cães, esta faixa etária corre maior risco de se contaminar por *Toxocara canis* (WON *et al.*, 2008; SCHOENARDIE *et al.*, 2013). Além disso, estudos realizados no sul do Brasil mostram que casos de toxocaríase estão presentes em níveis elevados (50,6%) (SCHOENARDIE *et al.*, 2013) e que a contaminação por ovos do parasita em áreas de lazer chega a 91,7% na região de Santa Maria (RS) (CORRÊA *et al.*, 1995; SANTARÉM *et al.*, 2009) e 62% em Pelotas (RS) (GALLINA *et al.*, 2011), o que pode estar relacionado principalmente às condições climáticas desta região que permitem que os ovos de *T. canis* se tornem embrionados.

Apesar das condições ideais socioepidemiológicas para a presença da toxocaríase ocorrerem nos países em desenvolvimento, estudos

soroepidemiológicos com crianças e adolescentes indicam uma alta prevalência da doença em várias regiões do mundo, incluindo países desenvolvidos (ALONSO *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2009; SVIBEN *et al.*, 2009; SCHOENARDIE *et al.*, 2013). Nos EUA, onde existem mais de 77 milhões de cães e 93 milhões de gatos (ESCH & PETERSEN, 2013), foram avaliados fatores de risco associados à pobreza, geografia e demografia, confirmando que ambos os fatores de risco em nível individual e geográfico afetaram a transmissão da toxocaríase (CONGDON & LLOYD, 2011).

2.2.3 Quadro Clínico

Os quadros clínicos da toxocaríase são causados pela migração das larvas de *Toxocara* spp. pelos tecidos de órgãos internos, incluindo músculos, fígado, cérebro e olhos. Esta migração pode ser assintomática ou pode gerar uma ampla variedade de sintomas clínicos, dependendo dos órgãos invadidos, da duração da migração, da intensidade de infecção e da resposta imune do hospedeiro, sendo o quadro clínico da infecção por *Toxocara* spp., relacionado com a migração das larvas e a resposta imunológica a elas (DESPOMMIER, 2003; FAN *et al.*, 2013; MACPHERSON, 2013).

A toxocaríase raramente é letal, porém as respostas inflamatórias à migração das larvas são associadas à linfadenopatia generalizada, hepatite granulomatosa, endomiocardite, endoftalmite, asma, leucocitose e eosinofilia (DESPOMMIER, 2003; FAN *et al.*, 2013).

2.2.3.1 Larva *migrans* visceral (LMV) / toxocaríase visceral

A LMV é gerada pela ingestão de grande quantidade de ovos embrionados de *T. canis*. Essa forma da doença é mais comumente diagnosticada em crianças com menos de oito anos de idade que vivem em condições socioeconômicas precárias (KAYES, 1997). Os sinais clássicos incluem febre, hepatoesplenomegalia, dor abdominal, vômitos, diarreia,

problemas respiratórios, asma, anorexia, perda de peso, fadiga, manifestações neurológicas, palidez e, ocasionalmente, urticária (DESPOMMIER, 2003).

2.2.3.2 Larva *migrans* ocular (LMO) / toxocaríase ocular

A LMO é considerada mais rara e pode estar relacionada com a baixa intensidade de infecção por *T. canis* (DESPOMMIER, 2003). Normalmente, é mais relatada em crianças, onde os casos são geralmente uniloculares e causados pela migração da larva de *T. canis* no olho e reações imunológicas resultantes. A deficiência visual ocorre ao longo de dias ou semanas, e o nível de dano é dependente da localização da larva, da eosinofilia e posteriormente da resposta granulomatosa fibrótica que pode resultar em cegueira, sendo a deficiência visual dependente da área específica envolvida (MACPHERSON, 2013).

2.2.3.3 Toxocaríase oculta ou comum (TC)

Algumas infecções por *T. canis* apresentam natureza clínica assintomática, leve ou não-específica que somente são identificadas por testes soropidemiológicos (TAYLOR *et al.*, 1988). Com isso, foi identificada a toxocaríase oculta ou comum (TAYLOR *et al.*, 1988; MAGNAVAL *et al.*, 1994; PAWLOWSKI, 2001), caracterizada em crianças por febre, anorexia, dor de cabeça, dor abdominal, náuseas, vômitos, letargia, sono, distúrbios de comportamento, sintomas pulmonares, dores nos membros, linfadenite cervical e hepatomegalia, e em adultos por fraqueza, prurido, erupção cutânea, sintomas pulmonares e/ou dor abdominal (MAGNAVAL *et al.*, 1994).

2.2.3.4 Neurotoxocaríase (NT)

A NT ocorre a partir da migração de larvas de *T. canis* para o sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) (RUTTINGER & HADIDI, 1991; CALDERA *et al.*, 2013), causando meningite, encefalite, mielite, vasculite

cerebral, convulsões, meningoencefalite ou mielite transversa (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013).

2.2.3.5 *Toxocara canis* associado a outras manifestações clínicas

Infecções por *T. canis* também tem sido associadas com diferentes manifestações clínicas como asma (SHARGHI *et al.*, 2001; BUSSE & MITCHELL, 2007; COBZARU *et al.*, 2012; KANOBANA *et al.*, 2013), epilepsia (NICOLETTI *et al.*, 2007; QUATTROCCHI *et al.*, 2012), convulsões (GOOD *et al.*, 2004) e problemas no desenvolvimento cognitivo (JAROSZ *et al.*, 2010; WALSH & HASEEB, 2012).

2.2.4 Diagnóstico

A diversidade de quadros clínicos da toxocaríase, associada aos diferentes locais em que as larvas podem se alojar no organismo humano dificulta o diagnóstico desta parasitose. Alguns testes não específicos podem auxiliar no diagnóstico da doença como: hemograma, o qual é caracterizado por uma grande concentração de eosinófilos no sangue que pode chegar a cerca de 10.000 células/mm³ na LMV, dez vezes mais do que o valor referencial (ALTCHEH *et al.*, 2003); exames citológicos do líquido cefalorraquidiano (LCR), que geralmente apresenta níveis de eosinofilia e pleocitose na NT (VIDAL *et al.*, 2003), e do humor aquoso ou vítreo, que identifica presença de eosinófilos na LMO (LIOTET *et al.*, 1992; FILLAUX & MAGNAVAL, 2013); e avaliação dos níveis séricos de IgE total, que se apresentam elevados na toxocaríase (MAGNAVAL *et al.*, 1994).

O diagnóstico definitivo da toxocaríase pode ser fornecido pelo exame pato-histológico para larvas de *Toxocara* spp. em materiais de biópsia. No entanto, é difícil realizar a detecção da larva em tecidos, e mesmo quando detectável, o diagnóstico é demorado, o que torna inviável a realização da biópsia de tecido (YAMASAKI *et al.*, 1998). Então, pelas dificuldades e incertezas do teste diagnóstico direto, o diagnóstico frequente da toxocaríase é

sustentado na apresentação clínica, histórico do paciente e testes sorológicos (MACPHERSON, 2013).

A primeira tentativa de desenvolvimento de um teste diagnóstico sorológico foi embasada principalmente na utilização de extratos solúveis de parasitos adultos de *T. canis* (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013). Muito ainda teve que ter sido pesquisado para que se chegasse ao imunodiagnóstico padrão da toxocaríase conhecido atualmente, baseado em teste ELISA utilizando o TES, para detecção de IgG anti-*T. canis* (MOHAMAD *et al.*, 2009), avaliado com valores de sensibilidade de 78% e especificidade de 92,3% (GLICKMAN *et al.*, 1978). Para aumentar a especificidade do teste, é realizada a adsorção de soros com antígenos de outros ascarídeos que podem ocasionar reatividade cruzada com *Toxocara* (SCHANTZ & GLICKMAN, 1983; SANTARÉM *et al.*, 2009), como *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichiuris trichiura* e *Enterobius vermicularis*, principalmente em países que apresentam altas prevalências destas parasitoses (LYNCH *et al.*, 1988; SANTARÉM *et al.*, 2009).

O antígeno TES é obtido a partir do cultivo de larvas de *T. canis* (LIMA, 2005), sendo o produto de excreção e secreção das larvas extraído e purificado a partir do meio de cultivo. A produção deste antígeno é laboriosa, de capacidade limitada, demanda tempo (MOHAMAD *et al.*, 2009), de fácil contaminação, requer técnicos treinados e disponibilidade de fêmeas adultas de *T. canis* (PEIXOTO *et al.*, 2011). Além disso, observa-se a reação cruzada desse antígeno com outras infecções parasitárias (MAGNAVAL *et al.*, 1991; YAMASAKI *et al.*, 2000), especialmente nos países tropicais, onde o poliparasitismo é comum (MACPHERSON, 2013). O fracionamento do antígeno e isolamento de suas proteínas diminui a possibilidade de reações cruzadas e poderia ser uma alternativa para melhorar a especificidade dos testes sorológicos atuais (PEIXOTO *et al.*, 2011).

As principais proteínas do antígeno TES possuem peso molecular de 32 kDa (TES-32), 55 kDa (TES-55), 70 kDa (TES-70), 120 kDa (TES-120) e 400 kDa (TES-400) (MAIZELS *et al.*, 1984). Essas proteínas são glicosiladas e antigênicas, sendo as proteínas de baixo peso molecular, 24-35 kDa, altamente específicas para *Toxocara* spp. (98,3%), diminuindo as reações cruzadas com outros parasitas, tornando-as potenciais para utilização como antígeno em imunodiagnóstico (ROLDÁN & ESPINOSA, 2009). Outra fração relevante é a

glicoproteína TES-120 a qual faz parte de um grupo de mucinas que formam os principais componentes do antígeno TES e do revestimento de superfície larval de *T. canis* (LOUKAS *et al.*, 2000), também sendo proposta como candidata adequada e altamente específica em ensaios de imunodiagnóstico da toxocaríase (FONG & LAU, 2004).

Além da utilização de proteínas isoladas do extrato TES para otimizar o diagnóstico, a utilização de antígenos recombinantes oferece diversas vantagens, uma vez que possibilita uma alta produção, é aplicável a rotina laboratorial e ensaios utilizando estes antígenos tem aumento de sensibilidade e especificidade em comparação aos ensaios que utilizam o antígeno TES nativo (MOHAMAD *et al.*, 2009).

Com isso, alguns grupos de pesquisa tem desenvolvido antígenos recombinantes com potencial aplicabilidade para o diagnóstico sorológico da toxocaríase, como o TES-30 (YAMASAKI *et al.*, 1998; YAMASAKI *et al.*, 2000; NORHAIDA *et al.*, 2008; MOHAMAD *et al.*, 2009) e o TES-120 (FONG *et al.*, 2003; FONG & LAU, 2004; MOHAMAD *et al.*, 2009), mas ainda são necessários estudos mais aprofundados para validar a utilização desses peptídeos como ferramentas diagnósticas.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Produzir os antígenos TES-30 e TES-120 de *Toxocara canis* em *Escherichia coli* para desenvolvimento de teste de diagnóstico para toxocaríase humana.

3.2 Objetivos Específicos

- Clonar, expressar e purificar os antígenos recombinantes TES-30 e TES-120 de *T. canis* produzidos em *E. coli*;
- Avaliar a antigenicidade das proteínas recombinantes por ELISA indireto frente a soros de humanos com toxocaríase;
- Identificar valores de sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico ELISA utilizando as proteínas recombinantes individualmente ou associadas.

4 Materiais e Métodos

4.1 Genes sintéticos

Para a expressão dos antígenos, genes sintéticos *tes-30* e *tes-120* foram desenhados, com auxílio do *software* Vector NTI 11 (Invitrogen), baseados nas sequências depositadas no GenBank sob o número de acesso 4586556 (*tes-30*) e 1103869 (*tes-120*) contendo sítios de restrição *Bam*HI e *Kpn*I para a clonagem no vetor de expressão pAE (Invitrogen). As construções foram sintetizadas pela empresa Epoch Life Science (Missouri City, Texas, EUA).

4.2 Clonagem dos genes sintéticos

Os genes sintéticos vieram clonados no plasmídeo pUC18, sendo denominados pUC18/*tes-30* e pUC18/*tes-120*. Estes plasmídeos foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* TOP10 por choque térmico, assim como o vetor de expressão pAE, seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). As transformações foram cultivadas em meio Luria Bertani Ágar (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 2% ágar) contendo 100 µg/mL de ampicilina por 18h em agitador 200 rpm a 37°C e, posteriormente foi realizada a extração dos plasmídeos com o kit *Illustra plasmidPrep mini spin* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

Estes plasmídeos foram clivados com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I. Após a confirmação da clivagem, por eletroforese em gel de agarose, o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) foi utilizado para purificar os fragmentos correspondentes ao gene *tes-30* e *tes-120* do gel, e o pAE clivado diretamente da reação.

Após a purificação, os genes *tes-30* e *tes-120* foram separadamente submetidos à reação de ligação no vetor pAE utilizando a enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific) na proporção 1:3 de vetor:inserto, resultando em plasmídeos pAE/*tes-30* e pAE/*tes-120*. O produto resultante da ligação foi utilizado para transformar, mediante choque térmico, a cepa TOP10F de *E. coli*. Após a transformação, os transformantes foram selecionados em placas com meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As colônias transformantes tiveram o DNA plasmideal extraído com fenol-clorofórmio e a verificação realizada por gel de agarose. Por fim, a presença dos insertos correspondentes aos plasmídeos pAE/*tes-30* e pAE/*tes-120* foi confirmada através da clivagem com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I.

4.3 Expressão e caracterização das proteínas recombinantes em *E. coli*

Clones recombinantes foram usados para transformar por choque térmico a cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star. O produto da transformação foi transferido para meio LB contendo ampicilina com 100 µg/mL, e deixado sob agitação de 200 rpm, a 37 °C por 18h. Após esse período, o pré-inóculo foi transferido para um inóculo com meio LB contendo o mesmo antibiótico. Quando atingiu densidade óptica relativa à metade da fase *log* ($DO_{600}=0,6-0,8$), a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para uma concentração final de 0,5 mM. As culturas, depois da adição do agente de indução, foram incubadas por mais 3h a 37 °C sob agitação de 200 rpm, sendo, ao final, retirado 1 mL, centrifugado 16.000g por 30s, suspenso em H₂O Milli-Q com tampão de corrida para avaliação por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%.

Após a identificação dos melhores clones, partiu-se para uma indução em larga escala. A transformação foi novamente por choque térmico com a cepa Star de *E. coli*. Cultivos em 25 mL de LB com ampicilina nas mesmas proporções já citadas foram realizados por 18h a 37°C. Posterior a isso, os cultivos foram transferidos para um volume de 500 mL de LB com antibiótico e a indução foi feita quando atingida a DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8.

Em seguida, os cultivos foram centrifugados (16.000g; 4 °C; 10 min), os *pellets* celulares foram suspensos em 20 mL de tampão Akta Wash (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole) com 100 µg/mL de lisozima e incubados por 2h a 4 °C, foram submetidos a rompimentos por ondas de ultrassom (sonicação) em sete ciclos de 20 segundos a 60Hz e então centrifugados novamente.

O sobrenadante foi armazenado e o *pellet* celular lavado com solução de PBS por três vezes, sofrendo centrifugação em cada intervalo das lavagens. Então, os precipitados celulares finais foram suspensos em tampão Akta Wash com Uréia (Akta Wash + Uréia 8 M), e deixados sob agitação por 48h a 4°C. O material foi centrifugado e o sobrenadante armazenado. Os sobrenadantes obtidos foram avaliados em SDS-PAGE 12%.

As frações contendo as proteínas rTES-30 e rTES-120 foram purificadas por cromatografia de afinidade com Níquel (Ni⁺²), utilizando colunas de gravidade His GraviTrap (GE Healthcare) e foram verificadas por SDS-PAGE 12% quanto à presença das proteínas recombinantes. Essas frações foram dialisadas primeiramente em tampão PBS com Uréia 6 M e em seguida foi realizada uma diálise gradual e lenta, em PBS para que ocorresse a diminuição da concentração de uréia aos poucos e assim não houvesse a precipitação das proteínas. Posterior a isso, os produtos da diálise foram quantificados com o kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific).

A caracterização das proteínas recombinantes foi feita por SDS-PAGE e *Western blotting*. Primeiramente, foi realizada a eletroforese em SDS-PAGE 12%, segundo Sambrook e Russel (2001). Para o *Western blotting*, após a separação das proteínas em gel de SDS-PAGE, foi realizada a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com leite em pó a 5% em PBS-T por 1h, lavada três vezes com PBS-T e incubada com anticorpo monoclonal anti-His (Sigma Aldrich), na diluição 1:6000, sob agitação

constante por 1h. Após três lavagens, a membrana foi incubada com anticorpo anti-camundongo produzido em cabra conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) diluído 1:1000 e revelada por Diaminobenzidina 3, 3' (DAB) acrescido de peróxido de hidrogênio. A reação com o cromógeno foi parada com água destilada.

4.4 Antigenicidade das proteínas recombinantes por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) Indireto

4.4.1. Soros humanos

Os soros humanos utilizados no experimento foram provenientes do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP) da Universidade de São Paulo, o qual possui uma soroteca com soros de pacientes com toxocaríase caracterizados. O critério para a identificação dos soros positivos baseou-se em dados clínicos (comprometimento pulmonar, hepatomegalia, asma, rinite, dor abdominal), epidemiológicos (onicofagia, geofagia, contato com cães e/ou gatos) e laboratoriais (eosinofilia maior ou igual a 10% e presença de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. pelo ELISA TES) e os soros negativos, de indivíduos saudáveis.

4.4.2 ELISA indireto

O ELISA indireto foi feito com amostras de 40 pacientes com sorologia positiva, 40 com sorologia negativa para toxocaríase e 40 soros provenientes de infecções com outros parasitas (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma* spp., *Strongyloides stercoralis*, *Hymenolepis nana*, *Fasciola hepática*). O ensaio foi realizado em uma microplaca de ELISA (Costar 3590) segundo o procedimento padrão de rotina realizado no IMT-SP. As placas foram previamente sensibilizadas com os antígenos recombinantes isolados e associados (rTES-30, rTES-120 e rTES30 + rTES-120), na concentração de 25 ng/poço diluídos em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6. A primeira

incubação foi realizada por 2h a 37°C, seguida por outra de 16h a 4 °C e, posteriormente, as placas foram lavadas três vezes por 5min com PBS-T. Houve o bloqueio da reação com BSA 1% por 1h a 37 °C e foram realizadas novamente as lavagens. Todos os soros foram diluídos na proporção de 1:160 em PBS-T. Os controles utilizados nas placas foram dois soros padrão positivo, três soros padrão não reagentes, um soro limiar de reatividade e triplicata dos brancos. Tanto os soros positivos como os negativos, em duplicata, foram incubados por 40min a 37 °C. Após três lavagens, o conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase (Sigma) diluído na proporção de 1:1000 também foi incubado por 40min a 37°C. Por fim, para a revelação da reação, foi utilizado o cromógeno TMB (Lifetech) incubado por 10min a temperatura ambiente, em seguida a reação foi parada com ácido sulfúrico 2N e a leitura da densidade ótica foi feita a 450nm.

Para estabelecer o ponto de corte dos ELISAs indiretos, foram utilizados os resultados de absorvância dos soros negativos. A média aritmética da absorvância destes soros foi acrescida de três desvios padrões (DP), sendo então, os valores iguais ou superiores a este valor, considerados positivos para a presença de anticorpos anti-*Toxocara* spp.. Ainda, o ponto de corte foi confirmado pela Curva de Características de Operação do Receptor (ROC), onde foi determinada a relação entre diferentes valores de sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes em comparação ao antígeno TES nativo, e encontrado, desse modo, o valor de ponto de corte que apresentasse melhores resultados.

5 Resultados

Para verificar a expressão, as proteínas recombinantes rTES-30 e rTES-120 foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blotting* frente a anticorpo monoclonal anti-His (Sigma Aldrich) 1:6000 (Figura 1). A partir dessas análises, foi possível observar uma banda com peso molecular de aproximadamente 25 kDa correspondente a rTES-30, e outra banda um pouco acima dos 25 kDa referente a rTES-120.

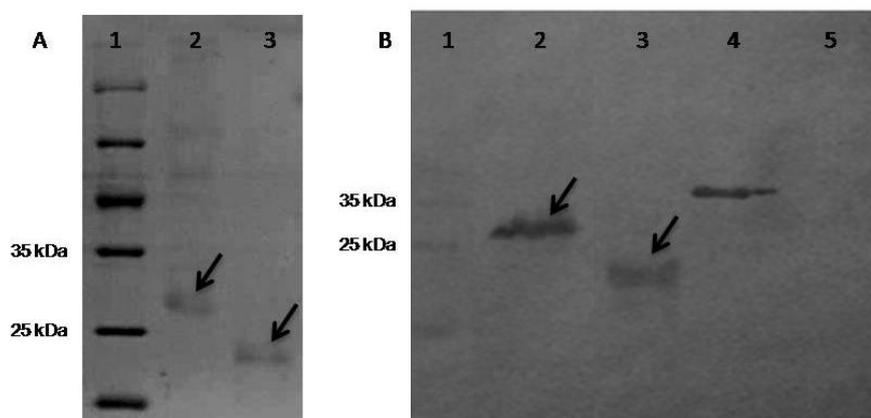


Figura 1 – (A) Avaliação da expressão das proteínas rTES-30 e rTES-120. As proteínas rTES-30 e rTES-120 produzidas em *E. coli* foram analisadas por SDS-PAGE 12% corado com Comassie Brilliant Blue R-250. 1- marcador de proteína (Thermo Scientific); 2- rTES-120; 3- rTES-30. (B) Caracterização das proteínas rTES-30 e rTES-120. As proteínas rTES-30 e rTES-120 produzidas em *E. coli* foram caracterizadas por *Western blotting* frente ao anticorpo monoclonal anti-6xHis. 1- marcador pré-corado (Thermo Scientific); 2- rTES-120; 3- rTES-30; 4- controle positivo rseM; 5- controle negativo

No ELISA indireto foram observados valores de especificidade de 100% para ambos os antígenos e de sensibilidade de 22,5% para rTES-30 e rTES30+ rTES-120 e 32,5% para rTES-120 quando usado o ponto de corte

referente a média das absorbâncias de soros negativos acrescida de três desvios padrões (0,471 para rTES-30; 0,432 para rTES-120 e 0,403 para rTES-30 + rTES-120). A princípio, foram obtidos valores de reatividade cruzada nulos com os soros de outras parasitoses testados, exceto por um soro de *Hymenolepis nana* que foi identificado como positivo pelos antígenos rTES-30 e rTES-120 quando testados isoladamente (Tabela 1). Foi identificada uma pequena diminuição dos valores de especificidade destes antígenos, baixando para 98,75% quando adicionados os valores de reatividade cruzada (Tabela 2).

Além disso, quando confirmados com os melhores pontos de corte pela análise ROC (0,3745 para rTES-30; 0,3165 para rTES-120 e 0,3155 para rTES-30 + rTES-120), estes valores foram de 95% de especificidade para ambos antígenos e de sensibilidade de 27,5%, 50% e 30% para os antígenos rTES-30, rTES-120 e rTES-30 + rTES-120, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 1 - Valores de sensibilidade, especificidade e reatividade cruzada de soros de pacientes com outras parasitoses em ELISA com os antígenos rTES-30, rTES-120 e rTES-30 + rTES-120 utilizando a média mais três desvios padrões como ponto de corte.

		Número de amostras positivas/ número total de amostras (%)							
Antígenos	Reação cruzada com soros de origem:								
	Pacientes com:							Indivíduos saudáveis (Especificidade)	Total de reatividade cruzada
	Sensibilidade	<i>Ascaris lumbricooides</i>	<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Ancylostoma</i> spp.	<i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>Hymenolepis nana</i>	<i>Fasciola hepatica</i>		
IgG total									
rTES-30	9/40 (22,5)	0/9	0/2	0/4	0/16	1/6	0/3	0/40 (100)	1/80 (1,25)
rTES-120	13/40 (32,5)	0/9	0/2	0/4	0/16	1/6	0/3	0/40 (100)	1/80 (1,25)
rTES30 + rTES120	9/40 (22,5)	0/9	0/2	0/4	0/16	0/6	0/3	0/40 (100)	0/80 (0)

Tabela 2 - Valores de especificidade incluindo reatividade cruzada de soros de pacientes com outras parasitoses em ELISA com os antígenos rTES-30, rTES-120 e rTES-30 + rTES-120 utilizando a média mais três desvios padrões como ponto de corte.

Antígenos	Número de amostras negativas/ número total de amostras (número de amostras falso-positivas)							
	Pacientes com:							
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Ancylostoma</i> spp.	<i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>Hymenolepis nana</i>	<i>Fasciola hepatica</i>	Indivíduos saudáveis	Total
IgG total								
rTES-30 (98,75% especificidade)	9/9 (0)	2/2 (0)	4/4 (0)	16/16 (0)	5/6 (1)	3/3 (0)	40/40 (0)	79/80 (1)
rTES-120 (98,75% especificidade)	9/9 (0)	2/2 (0)	4/4 (0)	16/16 (0)	5/6 (1)	3/3 (0)	40/40 (0)	79/80 (1)
rTES30 + rTES120 (100% especificidade)	9/9 (0)	2/2 (0)	4/4 (0)	16/16 (0)	6/6 (0)	3/3 (0)	40/40 (0)	80/80 (0)

Tabela 3 - Valores de sensibilidade e especificidade em ELISA com os antígenos rTES-30, rTES-120 e rTES-30 + rTES-120 de acordo com os melhores pontos de corte pela análise ROC.

Antígeno	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
rTES-30	27,5 (11/40)	95 (2/40)
rTES-120	50 (20/40)	95 (2/40)
rTES-30 + rTES-120	30 (12/40)	95 (2/40)

6 Discussão

A toxocaríase humana é uma doença de grande impacto à saúde pública, que acomete principalmente crianças de populações com baixas condições socioeconômicas (TORGERSON & MACPHERSON, 2011). Embora negligenciada, apresenta estimativas de soroprevalência relevantes que variam em todo o mundo, tornando-se uma das zoonoses mais comum e prevalente (MACPHERSON, 2013). Um diagnóstico mais eficiente, com maior especificidade e aplicável à rotina clínica se faz necessário, uma vez que o atualmente disponível apresenta limitações, ocasionando muitas vezes a não identificação e conseqüente não tratamento dos pacientes.

Como alternativa ao diagnóstico padrão atual, a utilização de antígenos recombinantes pode apresentar vantagens relevantes, tendo em vista que possuem uma alta capacidade de produção e ensaios utilizando estes antígenos tem demonstrado um aumento de sensibilidade e especificidade (MOHAMAD *et al.*, 2009). O método de ELISA indireto utilizando imunoglobulina IgG4, que vem sendo proposta como uma alternativa para melhorar a especificidade do teste quando comparado a IgG total (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013; MAGNAVAL *et al.*, 2014), tem demonstrado valores de especificidade para rTES-30 de 94,4% e para rTES-120 de 90,8% (MOHAMAD *et al.*, 2009), valores inferiores aos encontrados neste estudo (95% a 100%), onde foi utilizado IgG total. Porém, quando comparados aos resultados de sensibilidade, foram demonstrados valores superiores aos encontrados no presente ensaio (YAMASAKI *et al.*, 2000; MOHAMAD *et al.*, 2009), mesmo

quando realizada a análise de uma forma mais eficiente, pela ROC, possibilitando um acréscimo de cerca de 20% de sensibilidade utilizando o antígeno rTES-120, chegando ao valor de 50% de sensibilidade.

Esses dados podem ter sido obtidos, uma vez que as proteínas expressas foram produzidas em corpos de inclusão havendo a necessidade de utilização de um agente desnaturante (uréia 8 M) para serem solubilizadas e posteriormente sofrerem o correto enovelamento (*refolding*). Esse processo pode levar a perda de epítomos conformacionais importantes, fazendo com que não apresentassem a conformação reconhecida por anticorpos do sistema imunológico de humanos (MAIZELS, 2013). Outra suposição aos baixos valores de sensibilidade pode estar associada à pureza das proteínas produzidas e utilizadas no teste, visto que os corpos de inclusão são muitas vezes contaminados com componentes da parede celular das células hospedeiras que podem, por sua vez, induzir respostas biológicas endotóxicas em células imunes humanas (RUEDA *et al.*, 2014). Esta possível contaminação com componentes bacterianos de *E. coli* poderia estar associada ao elevado ponto de corte dos soros negativos, o que faz com que aumente o número de falsos negativos, diminuindo assim a sensibilidade do teste diagnóstico.

Contudo, mesmo com os valores encontrados nesse estudo, ainda existem alternativas para a otimização deste teste, como a produção dos antígenos de forma solúvel utilizando vetores que fusionam caudas de solubilidade como SUMO, por exemplo. Assim como a detecção de subclasses de IgG (RUBISNKY-ELEFANT *et al.*, 2010, MOREIRA *et al.*, 2014), principalmente a subclasse IgG4, tendo em vista que estudos anteriores encontraram valores de sensibilidade de 93,3% para ambos antígenos rTES-30 e rTES-120 produzidos em *E. coli* utilizando esta imunoglobulina (MOHAMAD *et al.*, 2009), sugerindo que esta subclasse possa ser mais prevalente na infecção do hospedeiro. Além disso, também é importante a melhora da padronização do protocolo do ELISA, dado que o ensaio testado levou em consideração o protocolo utilizado na rotina do ELISA-TES nativo, porém como os antígenos são diferentes, o teste com diferentes concentrações de antígeno, soro, conjugado e uma melhor padronização com valores mais próximos aos utilizados na literatura para antígenos recombinantes (MOHAMAD *et al.*, 2009) poderia ser capaz de influenciar a obtenção de melhores resultados.

7 Considerações Finais

Os resultados obtidos demonstraram que foi possível a produção das proteínas rTES-30 e rTES-120 em *E. coli*. Estes antígenos apresentam potencial para utilização como candidatos ao diagnóstico da toxocaríase humana, uma vez que foram reconhecidos por anticorpos anti-*Toxocara* spp., porém ainda há a necessidade de otimização do ensaio realizado para que haja uma melhora na identificação, acompanhamento e tratamento de pacientes com toxocaríase.

Referências

ABE-JACOB, C. M.; OSELKA, G. W. Toxocaríase na infância. **Pediatria**. v. 13, n. 2, p. 48-55, 1991.

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

ALTCHEH, J.; NALLAR, M.; CONCA, M.; BIANCARDI, M.; FREILIJ, H. Toxocaríase: aspectos clínicos y de laboratorio en 54 pacientes. **Anales de Pediatría**. v. 58, p. 425–431, 2003.

BUSSE, W. W.; MITCHELL, H. Addressing issues of asthma in inner-city children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 119, p. 43–49, 2007.

CALDERA, F.; BURLONE, M. E.; GENCHI, C.; PIRISI, M.; BARTOLI, E. *Toxocara* encephalitis presenting with autonomous nervous system involvement. **Infection** v. 41, p. 691–694, 2013.

CARVALHO, E. A. A.; ROCHA, R. L. Toxocaríase: larva migrans visceral em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria**. v. 87, n. 2, 2011.

CHIEFFI, P. P.; SANTOS S. V.; QUEIROZ M. L.; LESCANO S. A. Human toxocaríase: Contribution by Brazilian researchers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 51, p. 301–308, 2009.

COBZARU, R. G.; RIPA, C.; LEON, M. M.; LUCA, M. C.; IVAN, A.; LUCA, M. Correlation between asthma and *Toxocara canis* infection. **Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi**. v. 116, p. 727–730, 2012.

COÊLHO, R. A. L.; CARVALHO JR, L. B.; PEREZ, E. P.; ARAKI, K.; TAKEUCHI, T.; ITO, A. Prevalence of toxocariasis in Northeastern Brazil based on serology using recombinant *Toxocara canis* antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 72 p. 103–107, 2005.

COLLI, C. M.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; PALUDO, M. L.; FALAVIGNA, D. L.; GUILHERME, E. V.; MATTIA, S.; ARAUJO, S. M.; FERREIRA, E. C.; PREVIDELLI, I. T.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Serological clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban áreas of south Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 52. p. 69–74, 2010.

CONGDON, P.; LLOYD, P. *Toxocara* infection in the United States: the relevance of poverty, geography and demography as risk factors, and implications for estimating county prevalence. **International Journal of Public Health**. v. 56, p. 15–24, 2011.

CORRÊA, G. L. B.; MICHELON, E.; LAGAGGIO, V. R. A.; MOREIRA, W. S.; MORAES, R. Q.; LEITE, C. R. Contaminação do solo por ovos, larvas de helmintos e oocistos de protozoários, em praças públicas de Santa Maria e sua importância em saúde pública. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 4, p. 137, 1995.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 16, p. 265–72, 2003.

DUNSMORE, J. D.; THOMPSON, R. C. A.; BATES, I. A. Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, Australia. **Vet. Parasitol.** v. 16, p. 303–311, 1984.

DUTRA, G. F.; PINTO, N. P.; AVILA, L. F. C.; TELMO, P. L.; da Hora, V. P.; MARTINS, L. H. R.; BERNE, M. E. A.; SCAINI, C. J. Evaluation of the initial and chronic phases of toxocariasis after consumption of liver treated by freezing or cooling. **Parasitology Research**, v.112, n.6, p.2171-5, 2013.

EBERHARD, M. L., ALFANO, E. Adult *Toxocara cati* infections in U.S. children: report of four cases. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 59, p. 404–406, 1998.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 26, p. 58–85, 2013.

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

FAN, C.K., LIAO, C.W., CHENG, Y.C. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: genetics and environment. **Veterinary Parasitology**. v. 193, p. 342–352, 2013.

FIGUEIREDO, S. D. P.; TADDEI, J. A. A. C.; MENEZES, J. J. C.; NOVO, N. F.; SILVA, E. O. M.; CRISTÓVÃO, H. L. G. Estudo clínico-epidemiológico da toxocaríase em população infantil. **Jornal de Pediatria**. v. 81, p. 126-32, 2005.

FILLAUX, J.; MAGNAVAL, J. F. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. **Veterinary Parasitology**. v. 193. p. 327–336, 2013.

FISHER, M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. **Trends in Parasitology**. v. 19, p. 167–170, 2003.

FONG, M. Y.; LAU, Y. L. Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Parasitology Research**. v. 92, n. 2, p. 173–176, 2004.

FONG, M. Y.; LAU, Y. L.; INIT, I.; JAMAIAH, I.; ANUAR, A. K.; RAHMAH, N. Recombinant expression of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens TES-120 in *Escherichia coli*. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v. 34, p. 723–726, 2003.

GALLINA, T.; SILVA, M. A.; CASTRO, L. L.; WENDT, E. W.; VILLELA, M. M.; BERNE, M. E. Presence of eggs of *Toxocara* spp. and hookworms in a student environment in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p. 176–177, 2011.

GEMS, D.; MAIZELS, R. M. An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 93, p. 1665–1670, 1996.

GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiologic Reviews**. v. 3, p. 230-50, 1981.

Glickman, L.T., Schantz, P., Dombroske, R., Cypess, R., 1978. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 27, p. 492–498, 1978.

GOOD, B.; HOLLAND, C. V.; TAYLOR, M. R.; LARRAGY, J.; MORIARTY, P.; O'REGAN, M. Ocular toxocariasis in school children. **Clinical Infectious Diseases**. v. 39, p. 173–178, 2004.

JAROSZ, W.; MIZGAJSKA-WIKTOR, H.; KIRWAN, P.; KONARSKI, J.; RYCHLICKI, W.; WAWRZYNIAK, G. Developmental age, physical fitness and *Toxocara* seroprevalence amongst lower-secondary students living in rural areas contaminated with *Toxocara* eggs. **Parasitology**. v. 137, p. 53–63, 2010.

KAGAN, I.G. Serum-agar double diffusion studies with *Ascaris* antigens. **Journal of Infectious Diseases**. v. 101, p. 11–19, 1957.

KAYES, S.G. Human toxocariasis and the visceral larva migrans syndrome: correlative immunopathology. **Chemical Immunology**. v. 66, p. 99–124, 1997.

KANOBANA, K.; VEREECKEN, K.; JUNCO DIAZ, R.; SARIEGO, I.; ROJAS, L.; BONET GORBEA, M.; POLMAN, K. *Toxocara* seropositivity, atopy and asthma in children. **Tropical Medicine & International Health**. v. 4, p. 403–406, 2013.

LEE, A. C.; SCHANTZ, P. M.; KAZACOS, K. R.; MONTGOMERY, S. P.; BOWMAN, D. D. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. **Trends in Parasitology**. v. 26, p. 155–161, 2010.

LIMA, W. S. Larva migrans. *Parasitologia Humana*, 11^a ed. Rio de Janeiro, **Atheneu**, cap.31, p. 271-274, 2005.

LIOTET, S.; BLOCH-MICHEL, E.; PETITHORY, J.C.; BATELLIER, L.; Chaumeil, C. Biological modifications of the vitreous in intraocular parasitosis: preliminary study. **International Ophthalmology**. v. 16, p. 75–80, 1992.

LLOYD, S. *Toxocara canis*: the dog. **Institute of Biology**. p. 11–24, 1993.

LLOYD, S.; AMERASINGHE, P. H.; SOULSBY, E. J. L. Periparturient immunosuppression in the bitch and its influence on infection with *Toxocara canis*. **Journal of Small Animal Practice**. v. 24, p. 237–247, 1983.

LLOYD, S.; MORGAN, E. R. Toxocarosis. **Oxford University Press**. p. 787-797, 2011.

LOUKAS, A.; HINTZ, M.; LINDER, D.; MULLIN, N.P.; PARKINSON, J.; TETTEH, K.K.; MAIZELS R.M. A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. **Journal of Chemical Biology**. v. 15, n. 50, p. 275-79, 2000.

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

MACPHERSON, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. **International Journal for Parasitology**. v. 43, p. 999–1008, 2013.

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

MAGNAVAL, J. F.; FILLAUX, J.; FABRE, R. Diagnostic biologique de la toxocarose humaine. **Reveu Francophone des Laboratoires**. v. 464, p. 61-69, 2014.

MAGNAVAL, J. F.; MICHAULT, A.; CALON, N.; CHARLET, J. P. Epidemiology of human toxocariasis in La Reunion. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 88, p. 531–533, 1994.

MAIZELS, R. M.; DE SAVIGNY, D.; OGILVIE, B. M. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasite Immunology**. v. 6, p. 23-37, 1984.

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

MOHAMAD, S.; CHE AZMI, N.; NOORDIN, R. Development and Evaluation of a Sensitive and Specific Assay for Diagnosis of Human Toxocariasis by Use of Three Recombinant Antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 6, p. 1712–1717, 2009.

MOREIRA, G. M. S. G.; TELMO, P. L.; MENDONÇA, M.; MOREIRA, A. N.; MCBRIDE, A. J. A.; SCAINI, C. J.; CONCEIÇÃO, F. R. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. **Trends in Parasitology**. v. 30, n. 9, p.456-464, 2014.

NICOLETTI, A.; BARTOLONI, A.; SOFIA, V.; MANTELLA, A.; NSENGIYUMVA, G.; FRESCALINE, G.; PREUX, P.M. Epilepsy and toxocariasis: a case-control study in Burundi. **Epilepsia** v. 48, p. 894–899, 2007.

NORHAIDA, A.; SUHARNI, M.; LIZA SHARMINI, A.T.; TUDA, J.; RAHMAH, N. rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 102, n. 2, p.151-160, 2008.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; FERRARI, T. B.; NUNES, L. C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.103, n.1-2, p.19-27, 2002.

OVERGAAUW, P. A. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 23, p. 233–251, 1997.

OVERGAAUW, P. A., VAN KNAPEN, A. F. Dogs and nematode zoonoses. **CABI Publishing**. p. 213–256, 2000.

OVERGAAUW, P. A.; VAN KNAPEN, F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. **Veterinary Parasitology**. v. 193, p. 398–403, 2013.

PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. **Journal of Helminthology**. v. 75, p. 299–305, 2001.

PEIXOTO, P. L.; NASCIMENTO, E.; CANÇADO, G. G. L.; MIRANDA, R. R. C.; ROCHA, R. L.; ARAÚJO, R. N.; FUJIWARA, R. T. Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106, n. 2, p. 200-206, 2011.

QUATTROCCHI, G.; NICOLETTI, A.; MARIN, B.; BRUNO, E.; DRUET-CABANAC, M.; PREUX, P. M. Toxocariasis and epilepsy: systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 6, e1775, 2012.

ROLDÁN, W. H.; ESPINOSA, Y. A. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 3, p. 411-418, 2009.

RUBINSKY-ELEFANT, G.; HIRATA, C. E.; YAMAMOTO, J. H.; FERREIRA, M. U. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 104, n. 1, p. 3-23, 2010.

RUEDA, F.; CANO-GARRIDO, O.; MAMAT, U.; WILKE, K.; SERAS-FRANZOSO, J.; GARCÍA-FRUITÓS, E.; VILLAVERDE, A. Production of functional inclusion bodies in endotoxin-free *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 98, n. 22, p. 9229- 9238, 2014.

RUTTINGER, P.; HADIDI, H. MRI in cerebral toxocaral disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**. v. 54, p. 361–362, 1991.

SAMBROOK, J.; RUSSEL D. W. Molecular cloning. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. New York, 2001.

SANTARÉM, V. A.; SARTOR, I. F.; BERGAMO, F. M. M. Contaminação, por ovos de *Toxocara* sp, de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 31, p. 529-32, 1998.

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

SCHANTZ, P. M.; GLICKMAN, L. T. Ascaridos de perros y gatos: um problema de salud publica y de medicina veterinaria. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**. v. 94, p. 571-86, 1983.

SCHOENARDIE, E. R.; SCAINI, C. J.; BROD, C. S.; PEPE, M. S.; VILLELA, M. M.; McBRIDE, A. J. A.; BORSUK, S.; BERNE, M. E. A. Seroprevalence of *Toxocara* Infection in Children from Southern Brazil. **Journal of Parasitology**. v. 99, n. 3, p.537-539, 2013.

SHARGHI, N.; SCHANTZ, P. M.; CARAMICO, L.; BALLAS, K.; TEAGUE, B. A.; HOTEZ, P. J. Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinic-based case-control study. **Clinical Infectious Diseases**. v. 32, p. 111–116, 2001.

SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M.; MAGNAVAL, J. F.; SCHANTZ, P.; MAIZELS, R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends in Parasitology**. v. 25, p. 182–188, 2009.

STRUBE, C., HEUER, L., JANECEK, E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. **Veterinary Parasitology**. v. 193, p. 375–389, 2013.

SVIBEN, M.; CAVLEK, T. V.; MISSONI, E. M.; GALINOVIC, G. M. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection among asymptomatic children with eosinophilia in Croatia. **Journal of Helminthology**. v. 83, p. 369–371, 2009.

TAYLOR, M. R.; KEANE, C. T.; O'CONNOR, P.; MULVIHILL, E.; HOLLAND, C. The expanded spectrum of toxocaral disease. **Lancet**. v. 1, p. 692–695, 1988.

TORGERSON, P. R.; MACPHERSON, C. N. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. **Veterinary Parasitology**. v. 182, p. 79–95, 2011.

VIDAL, J. E.; SZTAJNBOK, J.; SEGURO, A. C. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 69, p. 341–343, 2003.

VINEY, M. E.; GRAHAM, A. L. Patterns and processes in parasite co-infection. **Advances in Parasitology**. v. 82, p. 321–369, 2013.

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

WON, K. Y.; KRUSZON-MORAN, D.; SCHANTZ, P. M.; JONES, J. L. National seroprevalence and risk factors for zoonotic *Toxocara* spp. infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 79, p. 552–557, 2008.

YAMASAKI, H.; ARAKI, K.; LIM, P.K.; ZASMY, N.; MAK, J.W.; TAIB, R.; AOKI, T. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 4, p. 1409-13, 2000.

YAMASAKI, H.; TAIB, R.; WATANABE, Y. I.; MAK, J. W., ZASMY, N., ARAKI, K.; LIM, P. K. C.; KITA, K.; AOKI, T. Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitology International**. v. 47, p.171–181, 1998.