

ERONIDES MARQUES DE SOUZA

“RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS DE BÚFALOS
(*Bubalus bubalis*) INFECTADOS NATURALMENTE
POR *Toxocara vitulorum*”

1210001210



ILHA SOLTEIRA/SP

Abril 2001



ERONIDES MARQUES DE SOUZA

**“RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS DE BÚFALOS
(*Bubalus bubalis*) INFECTADOS NATURALMENTE
POR *Toxocara vitulorum*”**

ILHA SOLTEIRA/SP

Abril 2001

BCpIS - FEIS - UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

Curso de Pós-Graduação em Zootecnia

ERONIDES MARQUES DE SOUZA

“RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS DE BÚFALOS
(*Bubalus bubalis*) INFECTADOS NATURALMENTE

POR *Toxocara vitulorum*”

1210001210

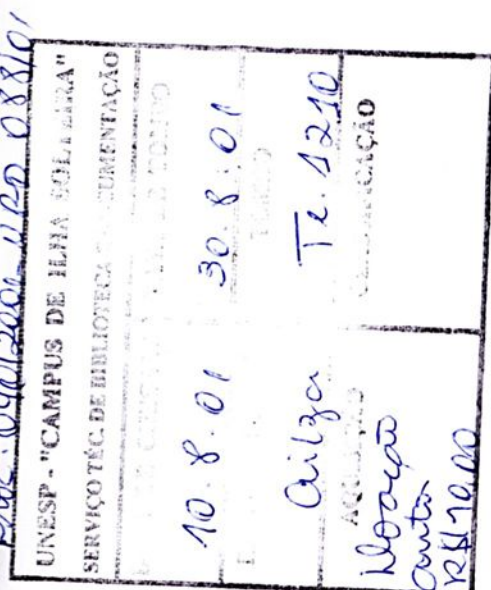


ORIENTADORA: D^{ra} WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Ilha Solteira, UNESP, para obtenção do título de
MESTRE EM ZOOTECNIA - Área de Concentração:
Sistema de Produção Animal

ILHA SOLTEIRA/SP

Abril 2001



50405004 produção
ANIMAL

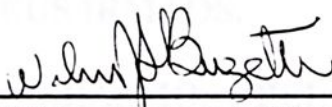
BCpIS - FEIS - UNESP

"Respostas Imunológicas de búfalos (*Bubalus bubalis*) infectados naturalmente por *Toxocara vitulorum*"

Eronides Marques de Souza

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE
ILHA SOLTEIRA – UNESP COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ZOOTECNIA**

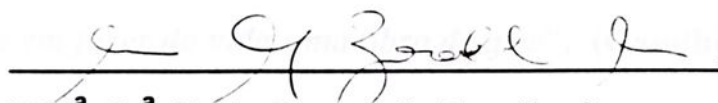
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a Wilma Aparecida Starke Buzetti - orientadora



Prof.^a Dr.^a Rosângela Zacarias Machado



Prof.^a Dr.^a Maria Conceição Zocoller Seno

**Ilha Solteira – SP
abril de 2001**

DEDICO ...

**PRIMEIRAMENTE A DEUS PELA GRAÇA DE
RECEBER A VIDA E A OPORTUNIDADE DE PODER
APROVEITAR AS BOAS INSPIRAÇÕES DE BEM VIVÊ-LA;**

A MINHA FAMÍLIA COM CARINHO:

A MEUS PAIS,

**CELSO E ERONIDES, POR SEUS ESFORÇOS EM ME
OFERECER ESTUDOS; AO AMOR E CARINHO, OS QUAIS
RETRIBUO COM MAIS ESTA CONQUISTA.**

AOS MEUS IRMÃOS,

**CELSO, EVERALDO E ERASMO, PELA AMIZADE,
INCENTIVO E COMPANHERISMO NOS MOMENTOS DIFÍCEIS
E DECISIVOS PELOS QUAIS PASSAMOS.**

“A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte”. (Gandhi)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista - UNESP/FEIS, em especial ao Departamento de Zootecnia, pela existência do curso e a oportunidade oferecida para fazer parte do mesmo.

A minha orientadora Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, pela paciência, atenção e sobretudo pela confiança e incentivo durante os dois anos de convivência. Agradeço pelos preciosos ensinamentos, dando-me exemplos de dedicação e inspiração à pesquisa.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino e Pesquisa - UNESP, pelo manejo e cuidados com os animais, bem como pelas incontáveis colheitas de materiais dos mesmos, os quais foram necessários para a realização deste experimento. Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia e em especial a João Augusto da Paixão, pelos valiosos auxílios nas horas e dias mais imprevisíveis.

A CAPES pelo auxílio com o beneficiamento da Bolsa de Estudos durante os 24 meses.

A Loacir da Silva e Eliana Barbosa, amigos Médicos Veterinários que me estimularam à realização de Pós-Graduação.

Especial ao amigo Fabiano Pan Ferreira, pela dedicação diária para a organização laboratorial; bem como pela paciência e amizade nesse um ano de convivência.



A prof.(a) Dra Maria Conceição Zocoller Seno pela paciência e atenção ao nosso trabalho, bem como pelas suas dicas e valiosas sugestões.

A prof.(a) Dra. Rosângela Zacarias Machado (UNESP/Jaboticabal-SP), pelas orientações e fornecimentos de materiais que nos faltavam para a realização do experimento. Ao Dr. Estephen G. Kayes (University of South Alabama-USA), por sua colaboração fornecendo-nos materiais que vieram enriquecer nosso trabalho. A prof.(a) Rita Carmem Braga Lima pelas correções ortográficas e gramaticais necessárias na estruturação dos textos.

A Seção de Pós-Graduação/FEIS e em especial a Maria de Fátima Sabino, pela pessoa formidável que é, como pela sua compreensão e preciosa ajuda.

Aos amigos Maria Francisca Neves pelos auxílios e dicas; com carinho a Antonio Carlos Noronha pelo companherismo e Susana Queiroz Santos Mello, pela solidariedade e apoio nos momentos de dificuldade. A Viviane Esse, pela acolhida no início do curso, bem como sua valiosa amizade. A Cássia de Avelar Gomes pelos momentos de alegria vividos no decorrer do curso.

A D. Creuza responsável pela limpeza do Departamento de Zootecnia, como também do Laboratório Imunoparasitologia, por sua alegria e boa disposição diária; às secretárias Meiri Sayuri Cruz por sua atenção a nós pós-graduandos e Zeneide Ribeiro Campos pelos serviços prestativos.

Enfim a todos os companheiros da Pós-Graduação em Zootecnia que convivi, os quais levo boas e inesquecíveis lembranças.



BIOGRAFIA

ERONIDES MARQUES DE SOUZA, filha de Celso Marques de Souza e Eronides Menezes de Souza, nasceu em 09 de fevereiro de 1972, no município de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul.

Cursou o secundário no Colégio Dom Bosco em Campo Grande, com término em 1989.

Ingressou em março de 1992 à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, graduando-se em Medicina Veterinária em janeiro de 1998.

Em março de 1999, ingressou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira, a nível de Mestrado, sendo bolsista da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



ÍNDICE

Página

ÍNDICE DE TABELA.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Local	21
4.2. Animais e manejo	21
4.3. Colheita de fezes, colostro e sangue	22
4.4. Antígenos de <i>T. vitulorum</i>	24
5. RESULTADOS	37
5.1. Parâmetros coprológicos.....	37
5.2. Padonização do método ELISA indireto.....	39
5.3. Níveis ELISA	44

5.4. Resposta imune humoral.....	48
5.5. Coeficiente de variação.....	61
5.6. Parasitismo x imunidade humoral.....	62
5.7 Reação cruzada com Ex de <i>S. papillosus</i>	64
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÕES.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ÍNDICE DE TABELAS

Página

TABELA 1. Períodos pré-patente, pico parasitêmico e patente, observados através de exames coprológicos (OPG) de bezerros búfalos infectados naturalmente por <i>Toxocara vitulorum</i> no ano de 1999	39
TABELA 2. Níveis ELISA indireto em soros de búfalas adultas e de bezerros búfalos utilizando-se o antígeno Ex (10 µg/ml).....	46
TABELA 3. Níveis de ELISA indireto em soros de búfalas adultas e de bezerros búfalos utilizando-se o antígeno ES (40 µg/ml).....	46
TABELA 4. Níveis de ELISA indireto em soros de búfalas adultas e de bezerros búfalos utilizando-se o antígeno LPE (10 µg/ml)	46
TABELA 5. Níveis de ELISA indireto em colostros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno ES (40 µg/ml).....	47
TABELA 6. Níveis de ELISA indireto em colostros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno Ex (10 µg/ml)	47

TABELA 7. Níveis de ELISA indireto em colostros de búfalas adultas
utilizando-se o antígeno LPE (10 µg/ml)..... 47

TABELA 8. Valores A/P, níveis ELISA obtidos em soros de búfalas adultas
utilizando-se o antígeno Ex (10 µg/ml), através do método ELISA indireto 49

TABELA 9. Valores A/P, níveis ELISA obtidos em soros de búfalas adultas
utilizando-se o antígeno ES (40 µg/ml), através do método ELISA indireto 50

TABELA 10. Valores A/P, níveis ELISA obtidos em soros de búfalas adultas
utilizando-se o antígeno LPE (10 µg/ml), através do método ELISA indireto..... 51

TABELA 11. Valores A/P, níveis ELISA obtidos em colostros de búfalas
adultas utilizando-se o antígeno Ex (10 µg/ml), através do método ELISA
indireto 53

TABELA 12. Valores A/P, níveis ELISA obtidos em colostros de búfalas
adultas utilizando-se o antígeno ES (40 µg/ml), através do método ELISA
indireto ELISA indireto 54

TABELA 13. Valores A/P, níveis ELISA obtidos em colostros de búfalas
adultas utilizando-se o antígeno LPE (10 µg/ml), através do método ELISA
indireto ELISA indireto 55

TABELA 14. Valores A/P, níveis ELISA obtidos em soros de bezerros
búfalos utilizando-se o antígeno Ex (10 µg/ml), através do método ELISA
indireto..... 57

TABELA 15. Valores A/P, níveis ELISA obtidos em soros de bezerros
búfalos utilizando-se o antígeno ES (40 µg/ml), através do método ELISA
indireto ELISA indireto 58

TABELA 16. Valores A/P, níveis ELISA obtidos em soros de bezerros
búfalos utilizando-se o antígeno LPE (10 µg/ml), através do método ELISA
indireto ELISA indireto ELISA indireto 59

TABELA 17. Coeficiente de variação do teste ELISA indireto 62

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Contagem de ovos de *Toxocara vitulorum* por grama de fezes (OPG) de bezerros búfalos nascidos no ano de 1999, durante o períodos de 1 a 180 dias de vida (n = 4 a 31) 38

FIGURA 2. Titulação em bloco dos soros de referência positiva (P) de búfalas adultas recém-paridas, n = 10 e negativa (N) de bezerros búfalos recém-nascidos sem mamar o colostro, n = 10, nas diluições de 1/100 a 1/1600, com o antígeno Ex de larvas de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,129 40

FIGURA 3. Titulação em bloco dos soros de referência positiva (P) de búfalas adultas recém-paridas, n = 10 e negativa (N) de bezerros búfalos recém-nascidos sem mamar o colostro, n = 10, nas diluições de 1/100 a 1/1600, com o antígeno ES de larvas de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,049 41

FIGURA 4. Titulação em bloco dos soros de referência positiva (P) de búfalas adultas recém-paridas, n = 10 e negativa (N) de bezerros búfalos

recém-nascidos sem mamar o colostro, n = 10, nas diluições de 1/100 a 1/1600, com o antígeno LPE de adultos de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,081..... 41

FIGURA 5. Soros de referência positiva (P) de búfalas adultas recém-paridas, n = 10 e negativa (N) de bezerros búfalos recém-nascidos sem mamar o colostro, n = 10; na diluição de 1/100, com antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml)de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,117..... 42

FIGURA 6. Titulação do colostro de referência positiva (P) de búfalas adultas no peri-parto, n = 8 e negativa (N) leite de búfalas adultas seis meses pós-parto, n = 2; nas diluições de 1/100 a 1/3200, com antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml)de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,133..... 43

FIGURA 7. Titulação do conjugado (diluições de 1/1000 a 1/5000) com soro de búfalas adultas no peri-parto (diluição 1/100, n = 1), com um dia pós-parto na presença dos antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml)de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0,002 a 0,049..... 45

FIGURA 8. Titulação do conjugado (diluições de 1/1000 a 1/5000) com colostro de Búfalas adultas no peri-parto (diluição 1/100, n = 1) e com seis meses pós-parto na presenaça de antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e

LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,325..... 45

FIGURA 9. Valores da amostra em relação ao positivo (A/P) de soros de búfalas adultas no período de 1 a 365 dias pós-parto (n = 4 a 12), utilizando-se antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da variou de 0,07 a 0,323..... 52

FIGURA 10. Níveis ELISA (NE) dos soros de búfalas adultas no período de 1 a 365 dias pós-parto (n = 4 a 12), com antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*, no nível quatro está representado o ponto de corte 52

FIGURA 11. Valores da amostra em relação ao positivo (A/P) de colostros de búfalas adultas no período de 1 a 60 dias pós-parto (n = 5 a 8), utilizando-se o antígeno ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0,036 a 0,298 55

FIGURA 12. Níveis ELISA (NE) dos colostros de búfalas adultas no período de 1 a 60 dias pós-parto (n = 5 a 8), utilizando-se os antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*, no nível quatro está representado o ponto de corte 56

FIGURA 13. Valores da amostra em relação ao positivo (A/P) de soros dos bezerros búfalos no período de 1 a 365 dias após o nascimento (n = 7 a 10),

utilizando-se o antígeno ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*. 1* = 1 dia de vida sem mamar o colostro. O desvio padrão da média variou de 0,033 a 0,293 60

FIGURA 14. Níveis ELISA (NE) dos soros de bezerros búfalos de 1 a 365 dias após o nascimento (n = 7 a 10), utilizando-se antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*, no nível quatro está representado o ponto de corte. 1* = 1 dia de vida sem mamar o colostro..... 61

FIGURA 15. Valores A/P (Amostra/Positivo) sorológicos comparados com o OPG de bezerros búfalos durante o período de 1 a 365 dias de vida (n = 7 a 10). 1* = 1 dia de vida sem mamar o colostro 63

FIGURA 16. Valores A/P (Amostra/Positivo) dos colostros de búfalas adultas comparados com OPG de bezerros búfalos no período de 1 a 150 dias pós-nascimento..... 64

FIGURA 17. Reatividade do antígeno Ex de *Strongyloides papillosus* e ES de *Toxocara canis* com soros de búfalas adultas e de bezerros búfalos com idade acima de 150 dias. Sendo que B (Tox⁻Str⁺) = bezerros com OPG negativo para *Toxocara vitulorum* e positivo para *S. papillosus* (n = 3); B (Tox⁺Str⁺) = bezerros com OPG positivo para *T. vitulorum* e positivo para *S. papillosus* (n = 3); V (Tox⁺) = búfalas adultas com OPG positivo para *T. vitulorum* (n=6); B (Tox⁺) = bezerros búfalos com OPG positivos para *T. vitulorum* B (Tox⁺) 66

FIGURA 18. Placa ELISA, reação dos soros de búfalas adultas, reagindo com antígeno Ex (10 µg/ml) de *T. vitulorum*. B = branco da reação; N = soro de referência negativa; P = soro de referência positiva 67

FIGURA 19. Placa ELISA reação dos soros de bezerros búfalos, reagindo com antígeno ES (40 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*. B = branco da reação; N = soro de referência negativa; P = soro de referência positiva *T. vitulorum* (n=6); B(Tox+) = bezerros búfalos com OPG positivos para *T. vitulorum* B(Tox+) 67

FIGURA 20. Placa ELISA, reação dos colostros de búfalas adultas, reagindo com antígeno Ex (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*. B = branco da reação; N = colostro de referência negativa; P = colostro de referência positiva *T. vitulorum*..... 68

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag = Antígeno

A/P = Amostra em Relação ao Positivo

D.P. = Desvio Padrão

ELISA = “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” – Ensaio imuno enzimático

ES = Excretor secretor

Ex = Extrato larval bruto

FcεRII = Receptores específicos para IgE

IgA = Imunoglobulina da classe A

IgE = Imunoglobulina da classe E

IgG = Imunoglobulina da classe G

IgM = imunoglobulina da classe M

IL = Interleucina

L1 = Larva estágio 1

L2 = Larva de estágio 2

L3 = Larva de estágio 3

LPE = Líquido Perientérico

NE = Níveis ELISA

OPG = Ovos por grama de fezes

PBS = Tampão fosfato-salina



RESUMO

Toxocara vitulorum é um nematódeo que parasita o intestino delgado principalmente de bubalinos (*Bubalus bubalis*). Este parasita ocorre em animais muito jovens, causando retardo no crescimento, levando os animais afetados até a morte. No presente trabalho, para se estudar a resposta imune humoral de búfalos naturalmente infectados com *T. vitulorum*, foi inicialmente realizada a padronização do método ELISA indireto (ensaio imuno enzimático indireto), utilizando-se soros de referência positiva (soros de búfalas no periparto), soros de referência negativa (soros de bezerros búfalos sem mamar o colostro) e antígenos extrato larval bruto (Ex), excretor secretor larval (ES) e líquido perientérico do adulto (LPE) de *T. vitulorum*. Através deste método, anticorpos anti-Ex, anti-ES e anti-LPE foram detectados e quantificados, utilizando-se amostras de soro de bezerros búfalos do nascimento aos 365 dias de idade, de soro de búfalas do parto aos 365 dias pós-parto e de amostras de colostro/leite do parto aos 60 dias pós-parto.

Os dados obtidos foram transformados em valores A/P (amostras em relação ao soro de referência positiva) e níveis ELISA (NE) agrupados de 0 a 9. O quadro parasitário dos bezerros búfalos foi avaliado por exames coprológicos periódicos (semanais até 60 dias, quinzenais até 180 dias e mensais até 365 dias de idade). Assim, verificou-se através do OPG (ovos por grama de fezes) que 85,3% dos bezerros búfalos

encontravam-se naturalmente infectados com *T. vitulorum* entre o período de 23 a 105 dias de idade. O pico do parasitismo ocorreu em média aos 44,3 dias para em seguida iniciar a expulsão espontânea destes parasitas através das fezes dos hospedeiros. Pela análise dos níveis de anticorpos IgG anti-Ex, anti-ES e anti-LPE dos bezerros búfalos com um dia de vida, mas sem mamar o colostro, constatou-se NE = 0. No entanto, estes níveis foram máximos (A/P = 0,798 a 0,907, NE = 6 a 7) em bezerros búfalos com a mesma idade (um dia), mas que mamaram o colostro.

Estes níveis de anticorpos (para os três tipos de antígenos), adquiridos passivamente via colostro, mantiveram-se altos mas, com leve declínio até próximo ao pico do parasitismo, quando então, começaram a declinar acentuadamente, coincidentemente com a diminuição do OPG, ou seja, no período de rejeição dos parasitas por seus hospedeiros. Os níveis dos anticorpos anti-Ex e anti-ES continuaram a declinar-se no soro até os animais atingirem a idade de 136 a 150 dias, quando então, começaram a elevar-se novamente. Já os níveis do anticorpo anti-LPE, começaram a elevar-se anteriormente aos demais (76-90 dias) e, a partir daí, mantiveram-se sempre superiores aos demais. Após a expulsão dos parasitas, os animais não mais apresentaram reinfecção intestinal no período de 120 a 365 dias. Com relação às búfalas, foram detectados altos níveis de anticorpos anti-Ex, anti-ES e anti-LPE por todo o período analisado. Os valores médios máximos de A/P e de níveis ELISA para os antígenos anti-ES, anti-Ex e anti-LPE foram bastante aproximados (A/P = 1,18; 1,1 e 1,19, respectivamente; NE = 8 para ES e Ex e NE = 7 para LPE). Os anticorpos colostrais detectados para os três antígenos também apresentaram valores muito semelhantes entre si. Os valores A/P e níveis ELISA foram máximos no primeiro dia pós-parto (ES = 0,999; Ex = 1,121 e LPE = 0,893 com NE = 7, 8 e 9, respectivamente), mantiveram-se altos até o sétimo dia, e então declinaram abruptamente. O anticorpo

anti-LPE ainda manteve no colostro, embora em níveis bem baixos, até 23 dias pós-parto. Observou-se reação cruzada de anticorpos anti-*T. vitulorum* com o antígeno ES de *Toxocara canis*, porém não com o antígeno Ex de *Strongyloides papillosus*. Concluindo, pela técnica de OPG, todos os bezerros encontraram-se naturalmente infectados por *T. vitulorum*; os antígenos Ex, ES e LPE analisados mostraram-se antigênicos; o método ELISA indireto mostrou-se adequado e sensível, porém não específico para a detecção de anticorpos anti-*T. vitulorum* sorológicos e colostrais. O método ELISA indireto possui valor de diagnóstico para toxocarose. A transferência de imunidade passiva através do colostro não protegeu os bezerros búfalos contra a aquisição desta parasitose mas, participou possivelmente, junto com outros mecanismos de defesa do processo de rejeição ou auto cura da infecção por *T. vitulorum*.

Palavras-chaves: *Toxocara vitulorum*, *Bubalus bubalis*, ELISA indireto, resposta imune humoral.



ABSTRACT

Toxocara vitulorum is a nematode parasite of the small intestine of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). This parasite occurs particularly in very young animals, causing decreased growth and mortality. To understand the development of immune humoral responses in buffalo calves and cows naturally infected with *T. vitulorum*, antibody levels to soluble extract larval antigen (Ex), excretor secretor larval antigen (ES) and adult perienteric fluid (PE) from *T. vitulorum* were measured by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Sample sera from ten buffalo cows at the first day after parturition and ten buffalo calves with one day of age but before suckling the colostrum were used as the positive and negative reference sera, respectively. The IgG antibody levels were measured in sera of buffalo calves from their birth through 365 days of age; in sera of buffalo cows from their parturition to 365 days post-parturition and colostrum of buffalo cows from the parturition to 60 days post-parturition. The immunological activity of each serum sample was determined calculating the sample to the positive rate (S/P) at each dilution, considering positive and negative sera as reference. S/P values were grouped into ELISA levels (EL), which ranged from 0 (lowest level) and to 9 (highest level). The serum was considered positive when EL was equal or higher than 4 (cut-off point). The parasitological status of the calves evaluated by EPG counts (eggs per gram of feces) revealed that 85.3% of the buffalo calves were found naturally infected by *T.*

vitulorum between 23 and 105 days of age. The maximum peak fecal egg counts in calf's feces was during 31 to 45 days, and after such period the number of EPG decreased and the adult nematodes were expelled by the host. Antibody levels from serum samples against Ex, ES and PE antigens were lowest in calves at one day of age before suckling the colostrum, and highest in calves at the same age but after suckling, indicating that the origin of antibodies at this time was the colostrum. The high antibody levels detected against all antigens, passively acquired, were kept up to 31 - 45 days, coincidentally with the maximum peak of EPG counts. Thereafter, antibody levels began to decrease simultaneously with EPG decreasing and worm expulsion by the hosts. Except anti-PE, which began to increase before (76 to 90 days), anti-Ex and anti-ES levels started increasing after the calves have reached 136 - 150 days old when serum antibodies remained continuing increasing in stable levels up 365 days old. Between 60 and 105 days, when serum antibodies were detected at decreasing levels, adult nematodes were expelled from the intestines and no more *T. vitulorum* eggs were found, suggesting development of acquired resistance. In the buffalo cow sera, on the other hand, have shown high levels of anti-Ex, anti-ES and anti-PE during all analyzed period; from the first day to 365 days post-parturition, with the highest levels during perinatal period (30 days before and after parturition). The highest mean S/P values and ELISA levels of anti-ES, anti-Ex and anti-PE were very similar: S/P = 1.18; 1.1 and 1.19, respectively; EL = 8 for anti-ES and anti-Ex, and 7 for anti-PE. The colostrum antibody levels detected for all three antigens were also very similar: S/P and ELISA levels were the highest at the first day post-parturition (ES = 0.999, Ex = 1.121 and PE = 0.893, with EL = 7, 8 and 9, respectively), kept in high levels until the seventh day and decreased abruptly during up to the fifteenth day. There was cross-reaction of anti-*T. vitulorum* antibodies with



T. canis ES antigen, but not with *Strongyloides papillosus* Ex antigen. By conclusion: Passively-acquired antibodies did not provide protection against *T. vitulorum* infection in buffalo calves, but may participate on the process of the worm expulsion and the development of acquired resistance and may protect the calves against the intestinal reinfection. Indirect ELISA method is useful for detection of anti-*T. vitulorum* antibodies from serum and colostrum of buffaloes. *T. vitulorum* ES, Ex and PE antigens showed antigenic characteristics and useful to study the immune humoral responses of buffaloes against this infection.

Key words: *Toxocara vitulorum*, *Bubalus bubalis*, indirect ELISA, immune-humoral response.



1 - INTRODUÇÃO

O *Toxocara vitulorum* é um ascaridídeo cujo parasita adulto é encontrado na primeira porção do intestino delgado de bovinos e de bubalinos, principalmente dos mais jovens. Os bezerros búfalos encontram-se precocemente parasitados, ou seja, já nos primeiros 30 dias de vida. Esta precocidade de infecção tem sido atribuída por muitos pesquisadores como sendo em decorrência da aquisição de larvas infectantes através do colostro materno. Porém, os animais permanecem infectados apenas nos primeiros 4 meses de vida, pois em seguida, adquirem resistência e eliminam espontaneamente os parasitas do trato intestinal através das fezes, por um processo denominado de auto-cura (Starke et al. 1983 e 1992).

No entanto, este helminto pode causar alta morbidade e mortalidade. Quando em grande quantidade, os adultos causam obstrução intestinal, lesões traumáticas na mucosa intestinal, cólicas, diarreias, emagrecimento progressivo e desidratação. As larvas liberam toxinas, provocam hepatites e broncopneumonias transitórias. A literatura especializada afirma que o estado nutricional e o manejo dos animais são fatores determinantes no desenvolvimento desta parasitose, bem como, suas manifestações clínicas.

Se por um lado, o controle de *T. vitulorum* no trato intestinal é relativamente fácil, o de larvas que estão realizando migrações teciduais pelo corpo do hospedeiro é

extremamente difícil, principalmente quando se encontram encapsuladas na musculatura e no cérebro. Desta forma, as larvas em hipobiose, principalmente nas búfalas adultas, constituem em vantagem para os parasitas, favorecendo a sobrevivência da espécie e sua disseminação através das matrizes. Sendo assim, seria conveniente que estudos imunológicos fossem realizados na tentativa de controlar esta parasitose dos búfalos, onde a larva pudesse ser morta nos tecidos, impedindo a sua migração para órgãos vitais ou de serem transmitidas aos animais mais susceptíveis.

Ao avaliar a resposta imune humoral de bubalinos infectados por *T. vitulorum*, Starke et al. (1999 e 2001) padronizaram o método imuno enzimático indireto (ELISA) para *T. vitulorum* e verificaram que os soros de búfalas adultas e bezerros búfalos reagiram fortemente com o antígeno extrato solúvel bruto de larvas deste parasita, indicando ser este método adequado para a mensuração dos níveis de anticorpos anti-*T. vitulorum* nestes animais.

Desta maneira, para estudar a resposta imune humoral de bezerros búfalos e de búfalas adultas durante o período de um ano, utilizou-se para esta pesquisa o método ELISA indireto, usando-se os antígenos excretor secretor (ES), extrato solúvel bruto (Ex) obtidos a partir da larva de terceiro estágio (L₃) e o líquido perientérico do adulto de *T. vitulorum*.



2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral:

Estudar a resposta imune humoral dos bubalinos infectados naturalmente por *Toxocara vitulorum*.

2.2 – Objetivos Específicos:

2.2.1 Estudo do quadro parasitário, através de exames coprológicos (OPG) de bezerros búfalos com 1 a 365 dias de idade;

2.2.2 Obtenção dos antígenos excretor secretor (ES) e extrato solúvel bruto (Ex) de larvas e do antígeno líquido perientérico (LPE) de adultos de *T. vitulorum*;

2.2.3 Padronização do método ELISA indireto, utilizando os antígenos ES, Ex e LPE ;

2.2.4 Detecção de anticorpos da classe IgG anti-ES, anti-Ex e anti-LPE através do método ELISA indireto em soros e colostros dos búfalos;

2.2.5 Estudo da reação cruzada entre antígeno de *Toxocara canis* (ES) e antígeno de *Strongyloides papillosus* (Ex) nos soros imunes anti-*T. vitulorum*.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

Neoascaris vitulorum (Goeze, 1782), *Toxocara* spp (Stilles, 1905), *Toxocara vitulorum* (Warren, 1970) é um nematódeo parasita de grandes dimensões, pertencente à superfamília Ascaridoidea (Railliet e Henry, 1915) e à família Ascarididae. Este parasita é encontrado comumente no intestino delgado de ruminantes e, entre estes, com maior frequência, de bubalinos e de bovinos jovens.

T. vitulorum causa alta morbidade e mortalidade, particularmente em bezerros búfalos de um a três meses de idade (Refuerzo e Albis-Jimenez, 1954; Das et al., 1955; Patnaik e Pande, 1963 e Starke et al., 1983).

De maneira geral, os búfalos encontram-se altamente infectados com *T. vitulorum*, aproximadamente dos 15 aos 90 dias de idade. O pico máximo de eliminação de ovos nas fezes dos animais ocorre aos 45 dias, mas em seguida, a contagem destes ovos declina e coincide com a expulsão natural dos parasitas adultos pelas fezes do hospedeiro. Neste período o OPG (ovos por grama de fezes) decresce rapidamente para alcançar o valor zero aos 120 dias de idade (Starke et al., 1996).

Esta precocidade de infecção, foi atribuída por alguns pesquisadores, como sendo pré-natal (Herlich e Porter, 1953; Refuerzo e Albis-Jimenez, 1954; Das et al, 1955). Posteriormente, experimentos com *T. vitulorum*, indicaram a possibilidade dos bezerros



búfalos adquirirem esta parasitose através do colostro (Warren, 1971; Tongson, 1971; Chauhan et al., 1974; Mia et al., 1975; Gautam et al., 1976; Baruah et al., 1981; Banerjee et al., 1983; Starke et al., 1992; Roberts, 1990a. e b.). Assim sendo, a transmissão transmamária tem um papel muito importante na infecção dos bezerros búfalos.

Araújo (1972), trabalhando com *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* e *Toxocara canis*, demonstrou que a larva infectante das espécies pertencentes ao grupo desses ascaridídeos seria a larva de terceiro estágio evolutivo (L3), comprovando que a segunda muda cuticular ocorre antes da eclosão dos ovos. Vidotto (1980) obteve a mesma conclusão em pesquisa realizada com *T. vitulorum*. O mesmo dado foi constatado posteriormente por Brunaska et al. (1995) estudando ovos de *T. canis*. Recentemente, Fagerholm et al. (2000) usando microscopia eletrônica de varredura, confirmaram a informação, constatando ser a larva L3 de *A.suum* encontrada em ovos nas fezes e em larvas no fígado e pulmões dos animais analisados.

Das et al. (1955) após repetidos exames coprológicos em búfalas adultas, não encontraram nenhum caso positivo de infecção intestinal, embora tenham acreditado que a forma visceral pudesse estar presente. Estes autores, pelos métodos rotineiros coprológicos, constataram a presença de ovos de *T. vitulorum* nas fezes dos búfalos, revelando resultados positivos, os quais muitas vezes, tarde demais para a adoção de medidas quimioterápicas. Isto porque, quando os animais começavam a eliminar os ovos pelas fezes, já se encontravam em estágio mais avançado e altamente infectados; com lesões nas vísceras ocasionadas pela migração e pelas toxinas eliminadas pelas larvas e pelos vermes adultos. Os autores verificaram também que na Índia, 80% dos bezerros búfalos morriam apesar das medidas quimioterápicas adequadas. Além disso, estes



helminhos adultos perfuravam a parede intestinal e atingiam outras vísceras, como o fígado (Srivastava, 1963).

Enyenihi (1969) constatou que os bezerros búfalos infectados com *T. vitulorum* mostravam uma progressiva redução no ganho de peso com o aumento do número de vermes adultos. Além disso, verificou clinicamente que os animais perdiam peso durante o segundo mês de vida, mostrando sinais clínicos de inapetência, anemia, diarreia, cólicas intermitentes, timpanismo, pêlos arrepiados e opacos. Roberts (1993) em sua revisão, cita como sinais clínicos além de anorexia e diarreia, a ocorrência de constipação entérica ao invés da diarreia; desidratação, esteatorreia, dor abdominal e um odor butírico no tubo digestivo. Pode ocorrer também, mas menos comumente, obstrução do trato alimentar do animal, intussuscepção e perfuração gástrica.

Estudos clínicos da toxocarose nos bezerros búfalos revelaram que essas migrações larvais ocasionavam sugestiva insuficiência hepática (Gupta et al., 1976) que podia ser ocasionada ou pela liberação de toxinas (Das et al, 1955) ou pelas lesões viscerais traumáticas (Srivastava, 1963). Além disso, Rai et al. (1971) citado por Gupta et al. (1976), observaram níveis elevados de histamina no sangue de bezerros infectados, correlacionados com as lesões teciduais e a toxemia. As irritações pulmonares que ocorriam pela infecção, normalmente durante os primeiros 8 a 21 dias, podiam provocar o desenvolvimento de uma reação inflamatória em torno da larva (Refuerzo et al., 1952; Enyenihi, 1970) levando os animais a um processo de pneumonia secundária à migração larval.

Este helminto realiza portanto, migrações pelo corpo do animal. De acordo com Herlich (1953), ao estudar camundongos, observou comportamento migratório da larva de *T. vitulorum* similar a outros ascaridídeos.



Chauhan e Pande (1972) através de infecção oral de camundongos albinos com ovos de *T. vitulorum*, tentaram elucidar a migração que este parasita realizava pelo organismo do hospedeiro. Desta maneira, por invasão da mucosa intestinal, as larvas foram encontradas no fígado, veia porta hepática, cavidade abdominal, mesentério, rins, pâncreas, baço, pulmões, coração, traquéia e esôfago.

Roberts (1990a) infectando búfalos jovens por via oral com larvas de *T. vitulorum* marcadas, observou que após 72 horas da ingestão das larvas, estas iniciaram a migração penetrando nos intestinos delgado e grosso, algumas migraram para os linfonodos mesentéricos, mas muitas dirigiram-se ao fígado pela via portal. Roberts (1990a) concluiu que as larvas poderiam: a) penetrar na parede intestinal, alcançar os capilares venosos e serem transportadas ao fígado pelo sistema porta; b) penetrar nos capilares linfáticos e alcançar os linfonodos mesentéricos; c) as não retidas no fígado ou linfonodos mesentéricos, poderiam ser transportados até os pulmões via artéria pulmonar e cardíaca; d) as retidas nos tecidos hepáticos, poderiam dirigir-se aos pulmões pela veia hepática. Não houve evidência de migração aos pulmões através do peritônio e nem pelo diafragma, mas somente pela via hepática (capilares ou vênulas). Grande número de larvas viáveis persistiam no fígado, porém, com o tempo, ocorria a migração das mesmas até os pulmões. Em seguida, do pulmão as larvas migravam para a traquéia (Enyenihi, 1970). Nesse órgão as larvas eram deglutidas, passando pelo esôfago e retornando ao intestino, onde alcançavam a maturidade sexual e eliminavam ovos pelas fezes (Warren, 1971; Mia et al., 1975; Roberts, 1990a e 1993).

Roberts (1993), em revisão de literatura, constatou que a larva de *T. vitulorum* realizava duas mudas dentro do ovo (L1 à L3), nenhuma muda no hospedeiro intermediário (materno) e duas no hospedeiro definitivo (L3 à forma adulta), completando assim 4 mudas no total. Segundo Meeusen (1999), as larvas de *T. canis*



realizam no tecido hepático uma muda, transformando-se em L4. Roberts (1993) citou em sua revisão, que no pico da liberação dos ovos pelas fezes, as fêmeas mediam em torno de 15 a 31 cm e os machos 10,5 a 20,4 cm. Citou ainda, que os búfalos poderiam ser encontrados com até centenas de exemplares adultos.

Como uma tentativa de proteção do hospedeiro parasitado, durante a rota de migração, as larvas podem ser encapsuladas através de reações inflamatórias imuno-celulares no fígado e nos pulmões, onde nestes locais muitas são mortas, embora uma pequena proporção ainda consegue escapar, seguindo a migração para a musculatura esquelética do hospedeiro (Warren, 1971).

Mia et al. (1975) consideraram as búfalas adultas como hospedeiros intermediários desta infecção, já que obtiveram resultados que confirmavam que a rota de infecção dos bezerros búfalos por *T. vitulorum* era oriunda do leite materno. No entanto, não conseguiram explicar como os parasitas no animal adulto, iriam tornar-se infectantes aos animais susceptíveis. Assim, o estresse provocado pela prenhez, pelo parto e pela lactação é que poderia contribuir para o desencadeamento desta parasitose. As búfalas, comportando-se como hospedeiros intermediários, seriam fontes de infecção aos seus bezerros ainda no período de lactação. A imunossupressão observada durante a prenhez e a lactação poderia ser provavelmente devido às alterações endocrinológicas que ocorre no animal nesse período. Níveis elevados de prolactina, corticosteróides adrenais e hormônios adrenocorticotróficos são supressivos *in vitro*; leva a supressão da reatividade do linfócito e aumenta a susceptibilidade aos nematódeos gastrintestinais (Lloyd, 1983). Portanto, a resposta imunológica deprimida no peri-parto tem importante papel na ecologia parasitária. O ciclo de vida do hospedeiro sincronizado com o do parasita pode trazer benefícios para a atividade parasitária e proporcionar uma fonte de infecção para as gerações totalmente susceptíveis da prole, pela prenhez (Noble et al., 1989). Banerjee



et al. (1983) ressaltaram a possibilidade do leite de búfala contaminado com larvas de *T. vitulorum* ter importância também em saúde pública, se o mesmo for consumido *in natura*, ou seja, sem sofrer nenhum tipo de processamento. Discute-se ainda, a possibilidade deste helminto ser também a causa da larva migrans visceral em humanos (Roberts, 1993).

Nos hospedeiros resistentes, búfalos adultos por exemplo, ou nos erráticos (ratos, camundongos, homem), as larvas de ascaridídeos podem alcançar níveis elevados no organismo parasitado, onde sobrevivem, permanecendo imóveis, em hipobiose (Omar e Barriga, 1991).

Roberts (1990a), usando larvas marcadas estudou o ciclo de vida de *T. vitulorum* em búfalos. Por este estudo, foi demonstrado que as larvas presentes no fígado e nos pulmões, 1 a 8 dias antes do parto, migravam para a glândula mamária através de vasos sanguíneos. Nesse órgão, a larva continuava seu crescimento e 90% delas, eram eliminadas através do colostro/leite, pela maioria das búfalas estudadas, durante os primeiros 6 dias após o parto. Concordantemente, Starke et al. (1992) evidenciaram a presença de larvas deste helminto no colostro/leite de búfalas, do parto ao 26º dia pós-parto (70% dos animais analisados). Sendo que 54,8% das búfalas mostraram-se positivas durante os 10 primeiros dias pós-parto. Ovos de *T. vitulorum* foram também encontrados nas fezes de búfalas adultas, principalmente durante o período de lactação. Já nas fezes dos bezerros búfalos, estes ovos começaram a ser detectados nos primeiros 20 dias e aos 30 dias de vida, 100% destes, já encontravam-se parasitados.

Estudos das alterações patológicas e do papel das células inflamatórias no controle de helmintos foram realizados por vários autores. Chauhan et al. (1974) infectaram experimentalmente ratos albinos e frangos com *T. vitulorum* e observaram as seguintes alterações: 1) grande número de larvas migrando em diferentes profundidades da parede

intestinal, principalmente na região cecal. A mucosa intestinal encontrava-se congesta e na região cecal, a mucosa apresentava-se com uma acentuada descamação apresentando áreas hemorrágicas nos locais de penetração; 2) uma zona de reação inflamatória local composta por eosinófilos, neutrófilos e acúmulo de eritrócitos e 3) congestão, a nível de mucosa e submucosa, dos vasos sanguíneos. Além da região intestinal, estes autores encontraram larvas que migraram também para a região do fígado dos ratos. Porém, nos frangos infectados, além do intestino e do fígado, as larvas foram encontradas também nos pulmões. No mesmo trabalho, constataram migrações pelos lóbulos hepáticos, bem como pela veia porta; o que resultou em extensas rupturas do parênquima hepático, como também atrações de células inflamatórias, principalmente de eosinófilos e neutrófilos. Também no tecido alveolar, as larvas estavam envolvidas por eosinófilos e eritrócitos. Em seguida, Tawfik (1975) estudou a migração larval de *T. vitulorum* em ratos e observou inflamação com infiltração celular, descamação e necrose na mucosa da parede intestinal (íleo e ceco). No fígado, foi observado hemorragia, alterações necróticas e formação de granulomas focais e difusos. Os pulmões encontravam-se hemorrágicos e com broncopneumonia.

Kayes e Oaks (1978) infectando camundongos com ovos de *T. canis*, observaram a formação de granulomas ao redor da larva infectante na musculatura. O granuloma inicial consistia basicamente pela presença abundante de eosinófilos evoluindo para um infiltrado de células inflamatórias de processo agudo. Durante as 48 horas seguintes, muitos dos eosinófilos encontravam-se sem grânulos e desintegrados. Com a evolução desse processo, macrófagos eram acrescentados ao fragmento celular resultante do granuloma, onde as células mononucleares eram predominantes nas lesões no final de 28 dias de infecção. Após 11 semanas, a larva inicial encontrava-se encapsulada por esse granuloma, o qual apresentava-se com um aspecto epitelióide e fibrótico.

Mackenzie et al. (1978) afirmaram que a cutícula de larvas infectantes e de parasitas adultos de *Trichinella spirallis* e *Nippostrongylus brasiliensis*, possuíam propriedades de ativar o sistema complemento de seus hospedeiros. Já as larvas recém eclodidas, causavam no hospedeiro uma intensa proliferação de eosinófilos com poder de aderência aos parasitas. Sugeriram que os hospedeiros, ao serem estimulados pelos parasitas, produziam anticorpos específicos para cada estágio particular do ciclo de vida. Além das células inflamatórias, já presentes, agindo contra a superfície dos nematódeos. Mackenzie et al. (1980) confirmaram a situação anterior e afirmaram ainda ser a via alternativa do sistema complemento a que atuaria na cutícula do parasita.

Philipp et al. (1980) observando a cutícula de *T. spirallis*, concluíram que esta poderia ser considerada como um órgão dinâmico, apresentando drásticas mudanças no nível molecular durante o processo de formação, e que estas modificações poderiam ocorrer durante o crescimento do parasita e estimular o sistema imune do hospedeiro.

Mackenzie et al. (1981) investigaram a interação *in vitro* de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos de rato com larvas de *T. spirallis* e *N. brasiliensis*, na presença de soro inativado, e observaram diferenças consideráveis de ação entre esses tipos celulares. Mastócitos aderiam às larvas e não se degranulavam. Eosinófilos aderiam, achatavam-se e degranulavam-se, restando apenas resíduos citoplasmáticos após 24 horas. Já a aderência de neutrófilos cessava após 2 a 24 horas e somente uma pequena área de sua membrana achatava-se. Os macrófagos aderiam permanentemente aos parasitas, mas não se achatavam e mantinham sua integridade.

Sugane e Oshima (1983) após reinfetar oralmente camundongos atímicos com ovos de *T. canis*, observaram grande número de larvas nos músculos esqueléticos e no cérebro desses animais. Já nos camundongos normais, obtiveram o maior número de larvas localizadas no fígado. Os autores reportaram que as larvas encontradas no fígado



estavam envolvidas por eosinófilos e assim ficaram retidas no órgão. Já nos camundongos atímicos não houve impedimento da migração larval por ação dessas células, concluindo que poderia existir uma dependência de linfócitos T para a formação de granulomas eosinofílicos.

Abo-Shehada et al. (1991) verificaram experimentalmente em camundongos infectados com *T. canis* que as larvas L3 pareciam retidas em uma reação granulomatosa na parede intestinal e no fígado, quando os animais já haviam sido previamente imunizados. Entretanto, a maioria destas larvas não morria e conseguia escapar dos granulomas para continuar a migração subsequente.

Jones et al. (1994) estudaram eosinófilos obtidos do lavado bronco-alveolar de pulmões de camundongos infectados experimentalmente através de ovos de *T. canis*. Eosinófilos colhidos deste lavado, eram negativos para as imunoglobulinas (Ig): IgM, IgA, IgE e para receptores de IgE (FcεRII). Foram positivos para IgG1 e os receptores desta imunoglobulina. No mesmo experimento *in vitro*, eosinófilos em culturas com IgE exógeno e/ou interleucina 4 (IL-4) não induziram a expressão de FcεRII (receptores Fc para IgE). Estes resultados, sugeriram que os eosinófilos não participavam imunologicamente, como células efectoras anti-parasitárias.

Sugane et al. (1996) fizeram a contagem de eosinófilos e concentrações de IL-5 no sangue periférico de camundongos infectados experimentalmente com ovos de *T. canis*. Com os resultados obtidos, concluíram que células imuno-competentes diferentes de eosinófilos, podem também apresentar papel significativo na expulsão e morte dos parasitas de *T. canis* no organismo infectado.

Os mecanismos imunes de defesa do hospedeiro, podem levar à uma lesão do parasita, morte ou até a um processo de expulsão natural do mesmo, conhecido como fenômeno da “auto-cura”, ou “cura espontânea”. Este termo foi inicialmente proposto

por Stoll (1929) para designar o processo de defesa ocorrido em carneiros infectados com *Haemonchus contortus*. Posteriormente, Taffs (1964) verificou que havia uma relação inversa entre o nível de anticorpos circulantes de suínos com a contagem fecal de ovos de *A. suum*.

Castro (1989 e 1992) descreveu a interrelação entre as células e o tecido local na resposta a reações imunofisiológicas visando a eliminação do parasita pelo hospedeiro. Neste processo incluíam: 1 – inflamação mediada pelo sistema imune com reações de hipersensibilidades (Tipo I – dependente de mastócitos; Tipo III – dependente de anticorpos, sistema complemento, plaquetas, mastócitos e de outras células da série mielóide; e Tipo IV – dependentes de linfócitos T e macrófagos); 2 – alterações morfológicas no hospedeiro: parasitas causando mudanças anatomofuncionais como hipertofia muscular pela proliferação de miócitos na parede intestinal por substâncias derivadas do parasita ou mediadores químicos da inflamação. Nestas respostas, mastócitos podem reconhecer sinais antigênicos e provocar alterações no transporte de íons (Cl^- , por exemplo) do epitélio pela ação da histamina, serotonina e prostaglandinas, alterando assim a motilidade intestinal. Posteriormente, Castro e Arntzen (1993) em uma revisão bibliográfica, demonstraram um modelo de comunicação entérica neuroimune, onde consideraram o sistema nervoso entérico (SNE) como um minicérebro. Mastócitos desse sistema detectavam antígenos e liberavam histaminas que agiam como importantes mensageiros químicos, atuando como um sinalizador neuroimune. O SNE portanto, responderia a sinais imunes pela estimulação antigênica na presença do parasita.

Desta maneira, Claerebout e Vercruysse (2000), relataram que o aumento de secreção de líquido, do peristaltismo intestinal e da alteração de células do sistema imune (por exemplo, mastócitos), possivelmente eram regulados pelo sistema nervoso entérico. Complementaram ainda, que o aumento da produção de muco intestinal e da

motilidade estavam associadas com a resposta do hospedeiro à infecção por nematódeos gastrointestinais. Esclareceram que esses nematódeos poderiam sobreviver a esses mecanismos por um processo de modulação ou mesmo por evasão da ação do sistema imune do hospedeiro.

Vários estudos sobre os aspectos imunológicos por infecções helmínticas vem sendo desenvolvidos com fins de diagnóstico e de controle através da produção de vacinas. Dentre os trabalhos que versam sobre este assunto, grande ênfase vem-se dando com relação ao *T. canis*, parasita de cães, devido a sua importância em saúde pública. No homem, os pacientes infectados com *T. canis* apresentam a síndrome da larva migrans visceral que é caracterizada por febre, eosinofilia periférica, hepatomegalia, pneumonia transitória, cegueira e transtornos cerebrais (Beaver et al., 1952; Oshima, 1961; Olson, 1961).

Alguns autores tem estudado a possibilidade de se utilizar larvas infectantes irradiadas, como um meio de provocar a imunidade específica no hospedeiro e assim desenvolver métodos de vacinação (Miller, 1971 ; Barriga e Myser, 1987).

De Savigny e Tizard (1977) obtiveram sucesso no uso do antígeno ES larval de *T. canis* para detecção de anticorpos séricos contra a síndrome da larva migrans visceral em humanos.

Conception e Barriga (1985) constataram a possibilidade de controle de *T. canis* pela vacinação. Barriga e Carrilo (1987) citado por Barriga (1991) produziram 76% de proteção contra a infecção em ratos pela vacinação com antígeno solúvel bruto de larvas de *T. canis*. Desta forma, os antígenos poderiam estimular a imunidade e então uma forte resposta protetora poderia atuar sobre todas as larvas susceptíveis.

Badley et al. (1987) verificaram que antígenos ES (excretor secretor) adsorvidos a imunosoros removiam alguns componentes do complemento e o anticorpo IgG das

superfícies larvais e impediam a adesão de eosinófilos sobre a membrana de larvas de *T. canis*, conferindo um mecanismo hábil desta larva na evasão de resposta imunológica por parte de seu hospedeiro.

Lombardi et al. (1990) verificaram a presença de um material eletrodenso encontrado na larva de *T. canis*, facilitando a aderência das células sobre sua superfície, formando assim uma camada sobre toda a superfície da larva. Esta substância poderia ser liberada pelo parasita pelas glândulas dos poros anais ou pelas glândulas esofágias das larvas. Recentemente, alguns autores tem estudado a composição bioquímica e a antigenicidade desta substância, designada como antígeno ES, secretada por larvas de ascaridídeos. No entanto, ainda existem discordâncias nestes estudos em relação ao número de componentes do antígeno ES de *T. canis*, assim como em seus pesos moleculares. Abo-Shehada et al. (1991) testaram o antígeno ES em ratos experimentalmente infectados com *T. canis* para conhecer o grau de proteção contra estes parasitas. Verificaram que os ratos vacinados apresentaram uma maior reação inflamatória na mucosa intestinal, dificultando a penetração da larva.

Meeusen (1999) afirmou que a estimulação antigênica pode persistir nos tecidos de animais parasitados, através de produtos das mudas das larvas, restos de larvas mortas ou material excretor secretor liberados da superfície da larva viva encapsulada ou migratória.

Se, por um lado, o controle de *T. vitulorum* adulto por anti-helmíntico é considerado relativamente fácil, o de larvas que estão nos tecidos dos hospedeiros é extremamente difícil, principalmente quando se encontram encapsuladas na musculatura e no cérebro (Abo-Shehada e Herbert, 1984). Desta forma, as larvas hipobióticas, principalmente nas búfalas adultas, constituem-se em vantagem para os parasitas, favorecendo a sobrevivência da espécie e sua disseminação através das matrizes. Além

disso, o parasitismo pela fase larval, a toxocarose, é um processo crônico no qual a larva sobrevive no tecido, geralmente dentro de granulomas (Warren, 1971; Roberts, 1990a), resultando em uma constante estimulação do sistema imune dos animais (Omar e Barriga, 1991).

Assim, seria conveniente que estudos imunológicos fossem realizados na tentativa do controle de *T. vitulorum* nos búfalos onde a larva pudesse ser morta nos tecidos. Preferencialmente no intestino impedindo a sua migração para órgãos vitais e serem transmitidas aos animais mais susceptíveis (Barriga e Omar, 1992). De acordo com estes autores, seria possível o controle desta verminose através de vacinação, e uma alternativa possível seria a imunização das mães para matar as larvas em seus tecidos antes delas passarem para os bezerros. Neste trabalho, os autores acima, verificaram através de repetidas infecções experimentais por *T. vitulorum* em coelhos usando antígenos de ovos embrionados, que o nível de IgG e IgMGA aumentava muito no soro após a terceira infecção. Pelo imunoblotting, indentificaram diferentes antígenos no curso das infecções, que poderiam estar relacionados com a proteção.

Amerasingue et al. (1992) através de prévia imunização parenteral de camundongos com diferentes antígenos solúveis de *T. vitulorum* (extrato larval, excretor secretor, ou fluido perientérico e suas frações) de larvas infectantes ou de parasitas adultos obtiveram uma proteção estatisticamente significativa contra a infecção. Os antígenos mais efetivos na proteção imunogênica foram os do fluido perientérico dos parasitas adultos (100% de proteção) e excretor secretor de larvas infectantes de *T. vitulorum* (>92% de proteção).

O ensaio imuno enzimático ELISA ("enzyme - linked immunosorbent assay") indireto, método utilizado para quantificação de anticorpos teve como pioneiros Engvall e Perlmann (1972). Com disponibilidade e variações de reagentes, como também a

necessidade da Ciência, esse método foi amplamente adaptado ao diagnóstico de várias infecções parasitárias de importância Médica Veterinária (Voller et al., 1976).

Machado et al. (1997) realizou ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-*B. bovis* em bovinos. Anticorpos sorológicos de bezerros infectados experimentalmente com *B. bovis* foram detectados, por este método, de 9 a 233 dias pós-infecção. Sendo que os títulos máximos de anticorpos apresentaram-se entre os dias 29 e 149 dias pós-infecção.

O teste ELISA indireto tem sido utilizado como uma técnica para o auxílio no diagnóstico da toxocarose, principalmente humana. É um importante teste no qual se baseia no uso de antígenos e anticorpos marcados com enzimas, onde o complexo resultante possui atividade imunológica e enzimática.

Desta forma, Jung e Pacheco (1960), Aljeboori e Ivey (1970) e Cypess et al. (1977) tentaram diagnosticar a toxocarose tanto canina como humana relacionada à zoonose da larva migrans. De Savigny et al. (1979) foram um dos primeiros pesquisadores na realização de diagnósticos sorológicos para toxocarose utilizando o ELISA, onde constataram que todos os pacientes testados que apresentavam toxocarose clínica, forneceram altos níveis de anticorpos ao serem comparados com a população saudável. Em seguida, Matsumura et al. (1984) usaram o ensaio ELISA "sandwich" para detecção de antígenos circulantes de *T. canis* em cães infectados por essa parasitose. Pelos resultados obtidos, concluíram que a resposta imunológica de cães infectados por *T. canis* não foi alcançada até 1 ou 2 meses após o nascimento, embora baixos níveis de anticorpos anti-*Toxocara* sp circulante, fossem detectados. A produção de anticorpo IgM também foi observada na infecção crônica em cães adultos.

Cuellar et al. (1990) verificaram que o parasitismo por larvas de *T. canis* era um processo crônico, no qual a larva sobrevivia nos tecidos, levando a uma estimulação do



sistema imunológico do animal parasitado. Afirmaram que a detecção do nível de anticorpos específicos não refletia o estado ativo do parasita. Estes autores obtiveram esta conclusão através da detecção da formação de complexos imune específicos, pelo método ELISA, com o uso do anticorpo monoclonal anti-ES de *T. canis* (TC-1) em coelhos. Os complexos imune específicos foram detectados somente em animais que receberam múltiplas doses de ovos infectante de *T. canis*. Após o início do tratamento anti-helmíntico com mebendazole® a concentração dos complexos imunes caiu bruscamente, permanecendo em níveis indetectáveis. Este resultado indicou importante alteração na atividade metabólica do parasita induzida pelo efeito quimioterápico.

Nunes et al. (1999) com intuito de aumentar a especificidade do diagnóstico sorológico da toxocaríase que rotineiramente é feito através do método ELISA indireto, desenvolveu um método de ELISA indireto de competição, utilizando IgG anti-ES produzida em coelhos e adsorvida a um polímero de extrato antigênico de adultos de *A. suum*. A avaliação do ELISA indireto de competição foi realizada em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de larva migrans visceral, obtendo valores finais de sensibilidade de 60,2%, bem como seu coeficiente de variação de 2,4%.

Com relação à espécie *T. vitulorum*, Bowman (1987) detectou pelo ensaio ELISA indireto, anticorpos IgG e IgM específicos em soros de camundongos infectados com *T. vitulorum*, e previamente imunizados com o antígeno ES das larvas deste helminto. Rajapakse et al. (1994) usando os testes de imunodifusão em gel e ELISA detectaram níveis de anticorpos no soro e no colostro de vacas búfalas no peri-parto de seus respectivos bezerros, animais naturalmente infectados por *T. vitulorum*. Anticorpos contra o antígeno ES de larvas e parasitas adultos foram detectados no colostro e no sangue das búfalas, bem como no sangue de seus respectivos bezerros. O nível de anticorpos anti-ES de parasitas adultos foi menor do que o do anti-ES larval. O pico dos

níveis de anticorpos para o antígeno larval no colostro das vacas e no soro de seus bezerros. Apresentou uma correlação inversa significativa, em relação à contagem máxima de ovos de *T. vitulorum* nas fezes dos bezerros, sugerindo uma possível proteção humoral contra os parasitas.

Starke et al. (1996 e 1999) testaram a resposta sorológica de búfalos infectados naturalmente por *T. vitulorum*. Neste experimento, utilizaram soros das búfalas no parto e de bezerros búfalos desde 1 dia de nascidos, antes e após mamarem o colostro, a até 180 dias de idade. Níveis de IgG sérico anti-Ex de larvas de *T. vitulorum* foram detectados nas búfalas e nos bezerros búfalos, através de ELISA indireto. Por outro lado, níveis zero de anticorpos foram detectados em soro de bezerros com um dia de vida que não haviam ingerido o colostro. Já os soros de bezerros que haviam recebido o colostro encontravam-se com níveis de anticorpos bem mais altos nos primeiros 15 dias, declinando por volta de 15 a 45 dias e permanecendo estáveis até completarem 180 dias de vida.

Segundo Meeusen (1999) imunopatologia é uma ciência que surgiu como consequência da aquisição de respostas imunes que ocorrem frente a agentes infecciosos parasitários. Este autor obteve várias conclusões: 1- os hospedeiros possuem vários mecanismo imunes, tanto humoral quanto celular (separados ou combinados), fornecendo proteção contra uma variedade de diferentes organismos patogênicos; 2- as reações imunes geralmente produzem mediadores tóxicos, tentando matar ou remover os patógenos; 3- pelo tamanho dos helmintos, sua invasão acarreta problemas ao hospedeiro, pois este não é capaz de detê-los pelo isolamento celular de fagócitos ou de células infectadas; 4- mecanismos potentes e tóxicos são requisitados para afetar os grandes parasitas, o que dificulta a recuperação do hospedeiro; 5- os parasitas possuem/adquirem mecanismos diferentes de evasão às respostas imunes do hospedeiro.

Claerebout e Vercruysse (2000) afirmaram que de acordo com as respostas efetoras em uma parasitose por nematódeos, dois parâmetros essenciais são necessários para avaliar a aquisição de imunidade. Os parâmetros imunológicos incluem: a produção de imunoglobulinas, IgE, IgA e IgG e a ação das células efetoras. Já o parâmetro parasitológico, inclui a contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG), contagem da carga parasitária, medidas do parasita e o número de ovos liberados por cada fêmea adulta. Quando ocorrer o decréscimo do OPG pode-se induzir que haverá um atraso, seguido de uma parada no desenvolvimento dos ovos, como consequência da diminuição na população de parasitas adultos. Em animal pré-imunizado a um determinado parasita, pode apresentar reduzida carga parasitária, como resultado, por exemplo, do aumento da mortalidade do parasita adulto. Reduções das medidas corporais do parasita pode ser devido à uma inibição no seu crescimento, uma seletividade na expulsão dos parasitas adultos ou ao não desenvolvimento do parasita até a fase adulta durante a infecção. Já a quantidade de ovos liberados pela fêmea está relacionada com a sua fertilidade.

Na presente pesquisa, avaliou-se como parâmetros parasitológicos, a contagem do OPG dos bezerros búfalos e como parâmetros imunológicos realizou-se a quantificação de imunoglobulinas não somente do soro dos bezerros búfalos e das búfalas adultas, como também no colostro das mesmas.



4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Colheita de leite, leite e leite de leite

4.1.1 – Leite

4.1 – Local

4.2 – Colheita de leite, leite e leite de leite

Os trabalhos a campo relacionados a este experimento, foram executados na Fazenda de Ensino e Pesquisa da UNESP, situada à margem direita do Rio Paraná, no município de Selvíria, no estado de Mato Grosso do Sul. A execução laboratorial do experimento, foi realizada no laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira - SP.

4.3 – Colheita de leite, leite e leite de leite

4.2 - Animais e manejo

4.4 – Colheita de leite, leite e leite de leite

Foram utilizados para a presente pesquisa bezerros búfalos, machos e fêmeas, mestiços (Murrah x Mediterrâneo), com idades variando de recém-nascidos a até 12 meses de idade e búfalas adultas, de recém - paridas até o próximo parto, durante o período de um ano.

4.5 – Colheita de leite, leite e leite de leite

O regime de criação destes animais foi o extensivo, onde os bezerros búfalos permaneceram junto com as mães até o desmame, pois as búfalas não eram

ordenhadas. O rebanho bubalino foi mantido em pastagem formada por capim braquiária (*Brachiaria decumbens*).

A reprodução foi feita através de monta natural, com nascimentos concentrados entre janeiro e abril de cada ano.

4.3 – Colheita de fezes, colostro e de sangue

4.3.1 – Fezes

As amostras de fezes foram colhidas dos bezerros búfalos, nos seguintes períodos (n = 4 a 31):

- Do dia do nascimento aos 90 dias de vida - semanalmente;
- De 90 dias de vida a até a idade de apresentar ausência de ovos de *T. vitulorum* nas fezes – quinzenalmente. Após os animais não mais apresentarem ovos nas fezes, as colheitas de fezes passaram a ser mensais.

Amostras fecais foram colhidas manualmente em um saco plástico, diretamente do reto de cada animal, para assim proceder o exame coprológico no laboratório, pelo método de McMaster conforme a técnica preconizada por Gordon e Whitlock (1939), modificada por Whitlock (1948).

Teve-se o cuidado de identificar cada amostra e de transportá-las para o laboratório em caixas de isopor com gelo.

4.3.2 - Colostro



As amostras de colostro/leite das búfalas ($n = 5$ a 8) foram colhidas, através da ordenha manual para frascos de 50 ml, no dia do parto e semanalmente por um período de 60 dias. Estas amostras foram transportadas da fazenda ao laboratório em caixas de isopor com gelo, permitindo o resfriamento necessário.

Estas amostras foram inicialmente centrifugadas a 461,9 G em centrífuga refrigerada HERMLE - Z323K (Labnet®) a 4°C, por 15 minutos. A seguir descartou-se a gordura concentrada na superfície superior do tubo com a amostra de colostro/leite. Cerca de oito gotas de coalho comercial, contendo ácido bórico, o qual possui poder “coagulante”, ou seja, de precipitar a caseína do leite, foram adicionadas ao mesmo. E este permaneceu incubado à 37°C, em estufa incubadora para B.D.O. (Fanem®) pelo tempo suficiente para que o leite coagulasse. O coágulo foi levemente homogeneizado, centrifugado pelo mesmo tempo e rotação da primeira centrifugação. O líquido sobrenadante foi separado e congelado a -70°C, em freezer da marca “Ultra-Low Freezer” (So Low®).

4.3.3- Soro sanguíneo:

A - Bezerros búfalos

As amostras de sangue dos bezerros ($n = 7$ a 10) foram colhidas diretamente da veia jugular, no dia do nascimento de cada animal, antes de receber o colostro da mãe e dentro das primeiras 24 horas após o recebimento do mesmo. Seguiu-se então, colhendo-se o sangue semanalmente até que os animais completassem 60 dias de vida, quinzenalmente até 180 dias e mensalmente até 12 meses.



B - Búfalas adultas

As amostras de sangue das búfalas ($n = 4$ a 12) foram colhidas semanalmente, através da veia jugular de búfalas ($n = 4$ a 12), do dia do parto a até 60 dias pós-parto; quinzenalmente de 60 a 180 dias pós-parto e mensalmente até o próximo parto.

4.3.3.1 - Processamento dos soros

Após a coagulação do sangue em temperatura ambiente o soro foi separado do coágulo em Centrifugador Excelsa Baby (Fanem®) a 461,9 G, por 10 minutos. As amostras de soro foram em seguida aliquotizadas em tubos de ensaio e congeladas a -70°C .

4.4 - Antígenos de *T. vitulorum*

4.4.1 - Obtenção de larvas infectantes

Exemplares adultos de *T. vitulorum* foram obtidos através da eliminação destes pelas fezes de animais tratados previamente com anti-helmíntico à base de Piperazina, na dose recomendada de 100 a 150 mg/kg de peso do animal.

As fêmeas colhidas foram previamente lavadas com detergente neutro e enxaguadas com água destilada até que estivessem completamente livres de resíduos fecais.

Estas fêmeas foram em seguida separadas para a retirada de seus úteros, através de cortes: transversal na altura do esôfago, e outro no terço final do corpo do



parasita. Com uma pinça, pressionou-se a extremidade posterior e com um estilete, em forma de taco de golfe, o corpo do verme foi pressionado no sentido pósterio - anterior para ajudar a expulsão do seu conteúdo.

Com o auxílio de um estilete, foi separado o intestino, um filete amarelado e os ovários, fios emaranhados ao redor do útero. Após a retirada do útero, este foi colocado em placas de Petri e perfurado para facilitar a liberação dos ovos. Em seguida, a suspensão de ovos foi deixada em placas de Petri de aproximadamente 8 cm de diâmetro, contendo água destilada numa profundidade de 0.5 a 1.0 cm e foram deixadas à temperatura ambiente, de acordo com a técnica de Smith (1989) com algumas modificações.

Diariamente as placas de Petri foram destampadas e agitadas por movimentos rotatórios para oxigenar a água. Após dois a quatro dias em geral, tempo médio em que o material encontrava-se deteriorado, filtrou-se o mesmo com auxílio de uma malha de "nylon" de 0,210 mm de abertura.

O material filtrado (ovos livres dos detritos) foi centrifugado várias vezes (3 a 4 vezes) a 230,95 G por um a dois minutos e em seguida foi deixado para incubar em temperatura ambiente, também em placas de Petri, com agitação diária para a oxigenação. A segmentação dos ovos foi acompanhada por exames diários ao microscópio óptico, até o desenvolvimento da larva infectante.

Constatando a forma infectante da larva, em torno de um mês, estes ovos foram colocados em tubos de centrifuga (15 ml) e ao sedimento foi colocado igual volume de solução de hipoclorito de sódio (14 % de cloro) por 20 minutos. Após este tempo, o material foi lavado várias vezes (dez vezes pelo menos) alternando com centrifugação em 461,9 G/dois minutos. Com este processo o ovo perdeu a sua casca externa, permanecendo assim, a larva envolta pela membrana vitelina. A liberação



dessas larvas da membrana vitelina foi feita através de rápida agitação manual ou borbulhamento de ar com auxílio de micropipeta de 1000µl.

4.4.2 - Preparação e conservação dos antígenos

As moléculas protéicas quando são extraídas de organismos vivos podem ser degradadas pelas enzimas proteases liberadas durante este processo (Maizels, 1991). Para evitar que isto ocorresse, utilizou-se inibidor de proteases: “Protease Inhibitor Cocktail General Use” (Sigma® P-2714), contendo floreto benzenesulfonil (AEBSF), bestatina, leupeptina, aprotinina, trans-epoxisuccinil-L-leucilamida (4-guanidino) butano (E-64) e EDTA sódio. O inibidor de proteases foi diluído em PBS (“Phosphatase Buffered Saline” ou Tampão de Fosfatase Salina) para conservação dos antígenos de acordo com Page et al. (1991).

A . Antígeno Ex (extrato larval bruto)

Após a obtenção das larvas infectantes de *T. vitulorum* como descrita no Item 4.4, estas larvas foram ultra-sonicadas com auxílio do aparelho ultrassônico Vir Sonic 1001 (Virtis®). Esta ultra-sonicação foi feita com média de três ciclos (monitorando em microscópio óptico, a necessidade da continuação dos ciclos), com potência de 10 watts e pulsações contínuas. Entre cada ciclo, a ponteira do aparelho foi mantida em solução de PBS gelada e o recipiente contendo as larvas em manipulação, foi deixado imerso em água contendo gelos triturados. A este material sonicado juntou-se à solução com inibidores de proteases na proporção de 1ml/10ml de solução de

antígeno. Esta suspensão foi deixada a 4°C por uma noite e posteriormente centrifugado, por duas vezes seguidas: a primeira a 692,85 G por 10 minutos e a segunda por 3695,15 G por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 10°C. O sobrenadante obtido foi filtrado em membranas Gelman Sciences® 0,22µm e aliquotizados a 500 µl em tubos de centrifuga. As amostras foram concentradas com auxílio de uma centrífuga à vácuo, Vacufuge™ Concentrator 5301 (Eppendorf®). Em seguida, estas aliquotas foram mantidas congeladas a -70°C.

B. Antígeno ES (excretor secretor)

O antígeno Excretor secretor (ES) foi obtido deixando-se as larvas infectantes em meio de cultura. Utilizou-se 10 ml de meio de RPMI - 1640 (Sigma® R-4130-L-Glutamine 25mmHEPES), adicionando-se antibiótico - Sigma® A-5955, constituindo na composição farmacológica, em um volume de 500 µl de diluição, a concentração de: 5.000 UI penicilina, 5 mg de estreptomicina e 10 µg de amphotericina B; 1 % de glicose; 0,85 % de NaHCO₃.

Adotou-se a proporção de 10.000 larvas eclodidas/10ml de meio de cultura. Estas larvas foram incubadas a 37°C em estufa CO₂ Incubator (SANYO®), com injeção de 5% de CO₂, por uma semana, segundo Amerasinghe et al. (1992). A cada semana, recolhia-se o sobrenadante da suspensão larval em cultura, realizando centrifugação a 461,9 G por cinco minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado em membranas de Gelman Sciences® a 0,2µm e adicionou-se ao líquido inibidores de proteases, na proporção de 1ml/5ml de solução de antígeno. Em seguida realizou-se uma diálise deste material com membrana específica para diálise "Spectra/Por

4.4.4.1 - Ensaio imuno enzimático - teste ELISA indireto

Para detecção da resposta imune humoral dos animais (bezerros búfalos e búfalas adultas) naturalmente infectados por *T. vitulorum*, amostras de soros sanguíneos e de colostros foram submetidas ao teste ELISA indireto, segundo a técnica de Waltisbuhl et al. (1987) e modificada por Machado et al. (1997).

Os testes imuno enzimáticos foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Zootecnia da UNESP - FEIS.

4.4.4.1.1 – Elementos da reação

A – Antígeno

Foram utilizados os antígenos extrato larval solúvel bruto (Ex), excretor secretor (ES) das larvas e do líquido perientérico (LPE) de parasitas adultos de *T. vitulorum*, preparados conforme descrição prévia e conservados a -70°C , até o momento do uso.

B – Soro/coloostro de referência positiva

Amostras de soros ($n = 10$) e de colostros ($n = 8$) de referência positiva foram obtidas de 10 e 8 búfalas adultas, respectivamente, naturalmente infectadas com *T. vitulorum* no peri-parto (imediatamente antes ou após o parto).



DispoDialyzers” (Spectrum®). Esta diálise foi realizada por 24 horas a 4°C, em becker contendo dois litros de PBS 0,01 M, de pH 7,4; com agitação constante. Após as 24 horas, as amostras aliquotizadas foram liofilizadas em tubos de centrifuga com 500 µl, concentrando-as em centrifuga à vácuo e estocadas a -70°C.

C. Antígeno LPE (líquido perientérico)

O antígeno LPE foi obtido a partir de parasitas adultos, machos e fêmeas. Na porção anal, com auxílio de agulha hipodérmica, fez-se a punção e a colheita do líquido perientérico

Este líquido foi centrifugado a 461,9 G por cinco minutos. O sobrenadante foi filtrado em membranas de Gelman Sciences® de 0,2 µm e adicionou-se a ele inibidores de proteases, na proporção de 1ml/5ml de solução de antígeno. Em seguida, este material foi dialisado como o procedimento anterior, aliquotizado em tubos de centrifuga de 500µl e estocados a -70°C.

4.4.3- Quantificação da proteína

A concentração protéica dos antígenos foi determinada usando o Kit de ensaio de proteína (Sigma® P-5656) pelo procedimento direto, usando reagente de Lowry. A leitura foi realizada em absorbância (comprimento de onda de 750 nm), utilizando o espectrofotômetro CE 2041 200-Series (CECIL®).

4.4.4 - Resposta imune humoral



C – Soro/coloostro de referência negativa

Amostras de soros e de colostros de referência negativa foram obtidas respectivamente de sangue de 10 bezerros búfalos em jejum colostral, no primeiro dia pós-nascimento; e de leite de duas búfalas com seis meses pós-parto.

D – Solução bloqueadora

A solução de bloqueio utilizada, constituiu-se de 5% de leite em pó desnatado (Molico®), diluído em Solução de Tampão Bicarbonato de Sódio (Na_2CO_3 ; NaHCO_3 e água destilada) a 0,05 M, com pH 9,6.

E - Conjugado

O conjugado utilizado foi a IgG de coelho anti-IgG de bovino acoplada à fosfatase alcalina (Sigma® - A-7914). A diluição utilizada deste foi de 1/1000, em PBS de pH 7,4; com Tween (0,05% de Tween-20: Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate - Sigma® P-7949) mais 5% de soro normal de coelho.

F – Substrato

O substrato utilizado na reação foi o parafenilfosfato diluído a 1 mg/ml em tampão dietanolamina pH 9,8 - 5mg/tablete (Sigma® 104). A proporção utilizada foi de 1 tablete de substrato para 5 ml de tampão.



4.4.4.1.2 – Descrição do ELISA indireto

Foram adicionados a cada orifício das microplacas de ELISA (microplacas, suportes flexíveis de 96 cavidades e com fundo chato – (Marca COSTAR®) 100 µl de antígeno diluído em Tampão Bicarbonato de Sódio; ajustando-se sua concentração protéica. A placa foi incubada a 4°C por 12 horas em câmara úmida.

Após a incubação do antígeno, adicionou-se a solução bloqueadora, incubando-a por uma hora em câmara úmida a 37°C. Nos intervalos das fases da reação, as microplacas foram submetidas a três lavagens, de três minutos cada, com o tampão PBS-Tween. Em seguida, 100 µl dos soros ou colostros diluídos em PBS foram convenientemente adicionados nas microplacas e incubadas em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Após este processo, foram adicionados 100 µl de conjugado na diluição 1/1000 e em PBS-Tween, citado no Item 4.4.4.1.1-E. As microplacas foram incubadas a 37°C por 60 minutos em câmara úmida. Em seguida, foram adicionados 100 µl da solução do substrato de reação (Item 4.4.4.1.1.F), incubando-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente (22°C - 25°C). Transcorrido esse prazo, a reação foi bloqueada pela adição de 30 µl de NaOH 3,0 M. A leitura foi realizada logo em seguida, respeitando tempo limite de no máximo 30 minutos após o bloqueio.

4.4.4.1.3 – Leitura da reação ELISA indireto

A leitura da reação (densidade óptica) foi realizada por meio de um espectrofotômetro para ELISA com filtro de 405 nm (EL-800 Universal Microplate



Reader: BIO-TEK® Instruments, INC.), sendo que o programa utilizado para a leitura foi o *KCjunior*® (série – S:164290).

Adotou-se como branco da reação a depressão da microplaca que continha todos os elementos da reação com exceção do antígeno e soro/coloostro dos bubalinos. Sendo que todas as amostras foram testadas em duplicatas.

4.4.5 - Tratamento dos dados

A atividade enzimática de cada soro/coloostro no teste ELISA indireto foi calculado mediante determinação de seu valor A/P. Este valor A/P (amostra em relação ao referencial positivo) de cada amostra de soro/coloostro foi calculado, levando-se em consideração os soros/colostros de referência positiva e negativa de acordo com a seguinte fórmula:

$$A/P = \frac{AMA - AMSRN}{AMSRP - AMSRN}$$

Onde: AMA – Absorbância Média das Amostras;

AMSRN – Absorbância Média do Soro Referência Negativa;

AMSRP – Absorbância Média do Soro Referência Positiva.

Os valores A/P foram agrupados em níveis ELISA (NE), os quais variaram de zero até nove (0 - 9). A amplitude máxima dos NE zero foi determinada pela média dos valores em absorbância de soro de animais não imunes contra *T. vitulorum* (soro de referência negativa), acrescido de dois desvio padrão da média correspondente. A

partir deste limite, os intervalos entre os outros níveis ELISA foram acrescidos de 35% cada; conforme preconizado por Machado et al. (1997), para o Sistema *Babesia* sp.

Os soros/colostros foram considerados positivos quando os valores A/P apresentaram-se superiores ou iguais ao NE quatro. Este ponto de corte foi obtido a partir do cálculo realizado, no qual multiplicou-se o valor da amplitude máxima do NE zero pelo coeficiente 2,5.

4.4.6 – Coeficiente de variação - CV

A avaliação do coeficiente de variação foi necessária para se determinar o erro da repetibilidade dos testes. Para isto, analisou-se individualmente os resultados dos três antígenos utilizados na presente pesquisa, frente aos soros de bezerros búfalos e das búfalas adultas, como do colostro das mesmas.

A fórmula utilizada, segundo Soares (1999) foi a seguinte:

$$CV = \frac{\sum CV(leit)\%}{NA}$$

Onde: $\sum CV(leit)\%$ = Somatória dos Coeficientes de Variação para a amostra

em duplicata, fornecido na leitura da reação ELISA em absorbância de

405nm

NA = número de amostras testadas

O coeficiente de variação foi calculado pelo programa utilizado para a leitura em absorbância pelo leitor ELISA (ver Item 4.4.4.1.3) para cada amostra testada em duplicata.



4.4.7 – Tipos de Ensaios Realizados

4.4.7.1. Determinação da dose de reatividade ótima de antígeno, de soro/coloostro e de conjugado (padronização do método ELISA)

As diluições ótimas das amostras de antígeno e de soro/coloostro de referência positiva e negativa foram determinadas através da titulação em bloco, fazendo-se reagir várias concentrações de antígeno frente a várias diluições de soro/coloostro e de conjugado.

Os antígenos utilizados foram o EX, o ES e LPE de *T. vitulorum*, em diferentes concentrações a saber: 5ug, 10ug, 20ug e 40ug.

Os soros/colostros foram testados em diluições seriadas, ou seja, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800.

O conjugado foi testado em diluição seriada de 1/1000 até 1/5000.

4.4.7.2. Determinação da curva da resposta imune humoral de bezerros búfalos de acordo com a idade

Após a determinação da dose de reatividade ótima do antígeno e dos soros/colostros de referência positiva e negativa e do conjugado através de titulação em bloco, testou-se os perfis imune humorais séricos de vacas e de bezerros búfalos parasitados com *T. vitulorum*, como também de colostros de búfalas pós-parto em condições naturais de campo (amostras de coloostro e de soro dos animais colhidas de acordo com o descrito nos Itens 4.3.2 e 4.3.3).

4.4.7.3. Teste de reação cruzada com antígenos ES de *T. canis* e *S. papillosus*

Foi realizado o teste ELISA indireto com antígenos larvais ES de *T. canis* (40 µg/ml), com soros de bezerros búfalos recém nascidos (n = 6) e de búfalas recém paridas (n = 6), diluídos a 1:100. O antígeno larval ES de *T. canis*, foi gentilmente cedido pelo Dr. Estephen G. Kayes do “Department of Structural and Cellular Biology”, University of South Alabama, Mobile, Al, USA.

O antígeno larval Ex de *S. papillosus*, foi obtido no próprio laboratório de imunoparasitologia, no Departamento de Zootecnia, UNESP/FEIS. O processamento deste antígeno foi semelhante ao realizado com o antígeno larval Ex de *T. vitulorum*.

Para se testar a reação cruzada do antígeno Ex de *S. papillosus* (20 µg/ml) com soros de bezerros búfalos, dividiu-se os animais em dois grupos: o primeiro grupo (n = 3) foi constituído por bezerros búfalos que coprologicamente eram positivos simultaneamente para *T. vitulorum* e *S. papillosus*. O segundo grupo (n = 3), por outro lado, era constituído por animais negativos ao *T. vitulorum*, mas positivos ao *S. papillosus* (Tox⁻ St⁺). Cabe ressaltar aqui que: a) os animais apresentaram um grau de parasitismo bastante baixo, onde o OPG médio foi de apenas 91,17 com desvio padrão de $\pm 79,52$; b) os animais positivos para *T. vitulorum* estavam com idades superiores a seis meses, para se excluir a possibilidade de aquisição de anticorpos passivos via colostro; c) não se excluiu a possibilidade dos animais negativos coprologicamente para *T. vitulorum*, de terem contato com este parasita e de desenvolverem imunidade humoral, uma vez que os mesmos não foram isolados do foco de infecção; d) todos os



animais utilizados para a detecção de reação cruzada apresentavam anticorpos sorológicos anti-ES, Ex e LPE de *T. vitulorum*.

5 - RESULTADOS

5.1 - Parâmetros coprológicos

Os resultados dos exames coprológicos representados por ovos por grama de fezes (OPG) e dos bexectos totais nascidos em 1980, estão representados na Figura 1 e Tabela 1.

Pelas imagens de ovos de *T. vitulorum* constatou-se que os animais iniciaram o parasitismo, *lar pró-pa-ntic*, em torno dos 23 ± 36 dias ($30,3 \pm 3,9$ dias) e atingiram o pico do parasitismo no período de 35 ± 57 dias ($44,1 \pm 6,6$ dias) de vida. A seguir, iniciou a declínio no número de ovos, até que entre 106 e 120 dias de idade a produção de ovos atingiu-se níveis baixos até completarem 365 dias (dados não apresentados). Desta maneira, o período em que os animais apresentaram-se parasitados (período de infecção) ficou em 57,36 dias (24 ± 33 dias).

Além disso, observou-se, através de exames coprológicos (Figura 1), que o parasitismo em bexectos totais por *T. vitulorum* pode ser caracterizado por 4 fases, a saber: Início do parasitismo com detecção de OPG; Pico do parasitismo, com OPG máximos; Período de parasitismo em declínio do OPG; Resposta com ausência de OPG.

5 - RESULTADOS

5.1 – Parâmetros coprológicos

Os resultados dos exames coprológicos representados por ovos por grama de fezes (OPG) dos bezerros búfalos nascidos em 1999, estão representados na Figura 1 e Tabela 1.

Pelas contagens de ovos de *T. vitulorum* constatou-se que os animais iniciaram o parasitismo, fase pré-patente, em torno dos 23 a 36 dias ($30,3 \pm 3,9$ dias) e atingiram o pico do parasitismo no período de 35 a 57 dias ($44,3 \pm 6,6$ dias) de vida. A seguir, iniciou o declínio no número de ovos, até que entre 106 e 120 dias de idade a presença de ovos negativasse acompanhados até completarem 365 dias (dados não apresentados). Desta maneira, o período em que os animais encontravam-se parasitados (período de patência) ficou em 57,55 dias (28 ± 86 dias).

Além disso, constatou-se, através de exames coprológicos (Figura 1), que o parasitismo em bezerros búfalos por *T. vitulorum* pode ser caracterizado por 4 fases, ou seja: Início do parasitismo com ascensão do OPG; Pico do parasitismo, com OPG máximo; Expulsão do parasita com diminuição do OPG; Pós-expulsão com ausência do OPG.

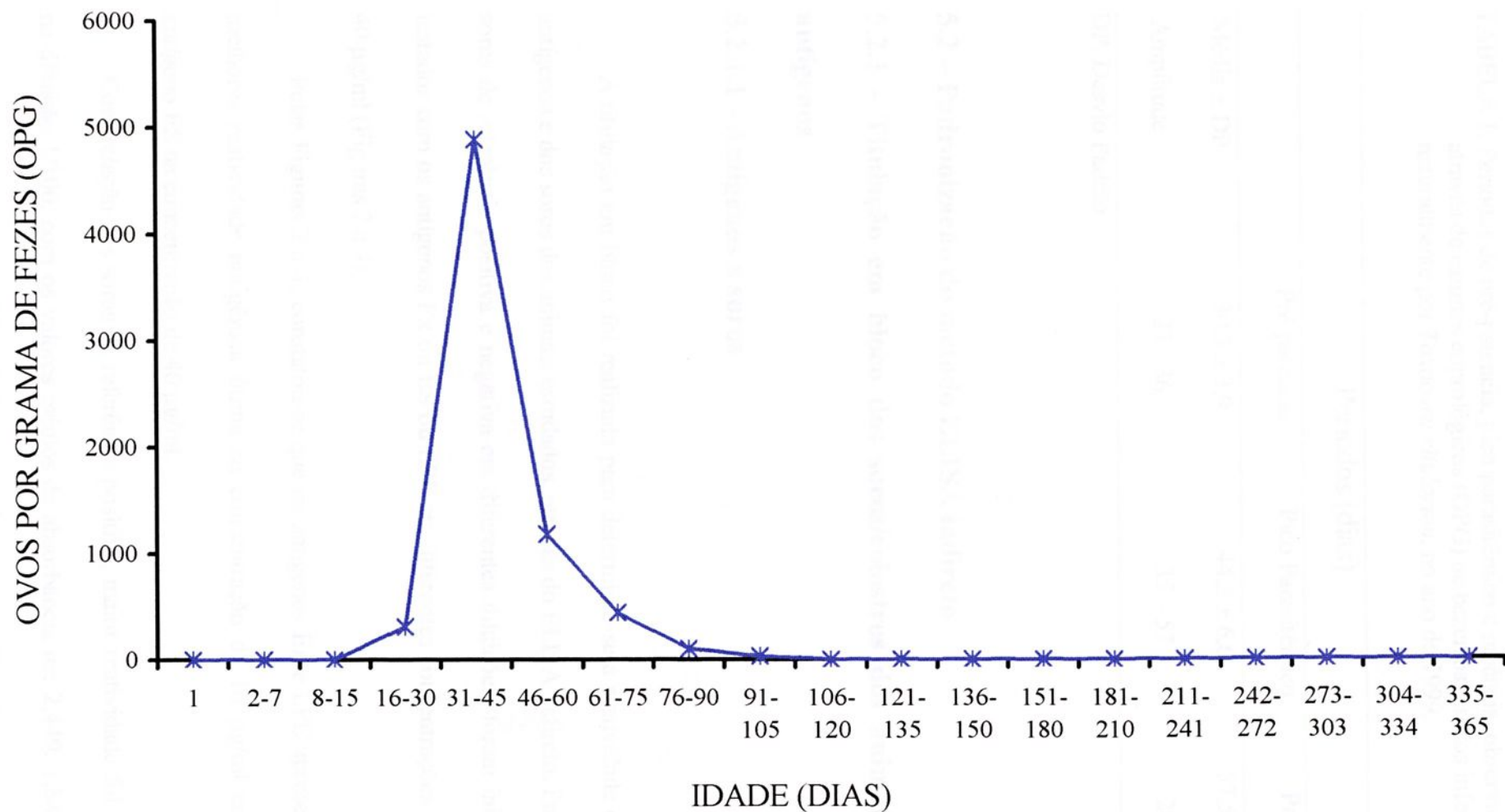


FIGURA 1. Contagem de ovos de *Toxocara vitulorum* por grama de fezes (OPG) de bezerros búfalos nascidos no ano de 1999, durante o período de 1 a 365 dias de vida (n = 4 a 31).

TABELA 1. Períodos de pré-patência, pico parasitêmico e patência, observados através de exames coprológicos (OPG) de bezerros búfalos infectados naturalmente por *Toxocara vitulorum*, no ano de 1999.

	Períodos (dias)		
	Pré-patência	Pico Parasitêmico	Patência
Média ± DP	30,3 ± 3,9	44,3 ± 6,6	57,5 ± 20,81
Amplitude	23 - 36	35 – 57	28 – 86
DP. Desvio Padrão			

5.2 – Padronização do método ELISA indireto

5.2.1 - Titulação em bloco dos soros/colostros dos animais e dos antígenos

5.2.1.1 - Antígenos x soros

A titulação em bloco foi realizada para determinar-se a reatividade ótima dos antígenos e dos soros dos animais estudados, através do ELISA indireto. Para isto, os soros de referência positiva e negativa em diferentes diluições, foram inicialmente testados com os antígenos Ex ou ES ou LPE em diferentes concentrações 5 µg/ml a 40 µg/ml (Figuras 2 a 4).

Pelas Figuras 2 a 4, constatou-se que os antígenos Ex e LPE apresentaram as melhores reatividade antigênica ótima na concentração de 10 µg/ml enquanto o antígeno ES na concentração de 40 µg/ml.

Com relação aos soros de referência positiva, maior reatividade foi verificada na diluição 1/100, com os valores médios de absorbância de: 2,449; 1,846 e 2,426 contra os antígenos Ex, ES e LPE, respectivamente. Além disso, nesta mesma

diluição (1/100) observou-se valores baixos de absorbância para os soros de referência negativa de: 0,039; 0,008 e 0,065 para os antígenos Ex, ES e LPE, respectivamente. Nestas condições houve ótima discriminação entre os resultados negativos e positivos.

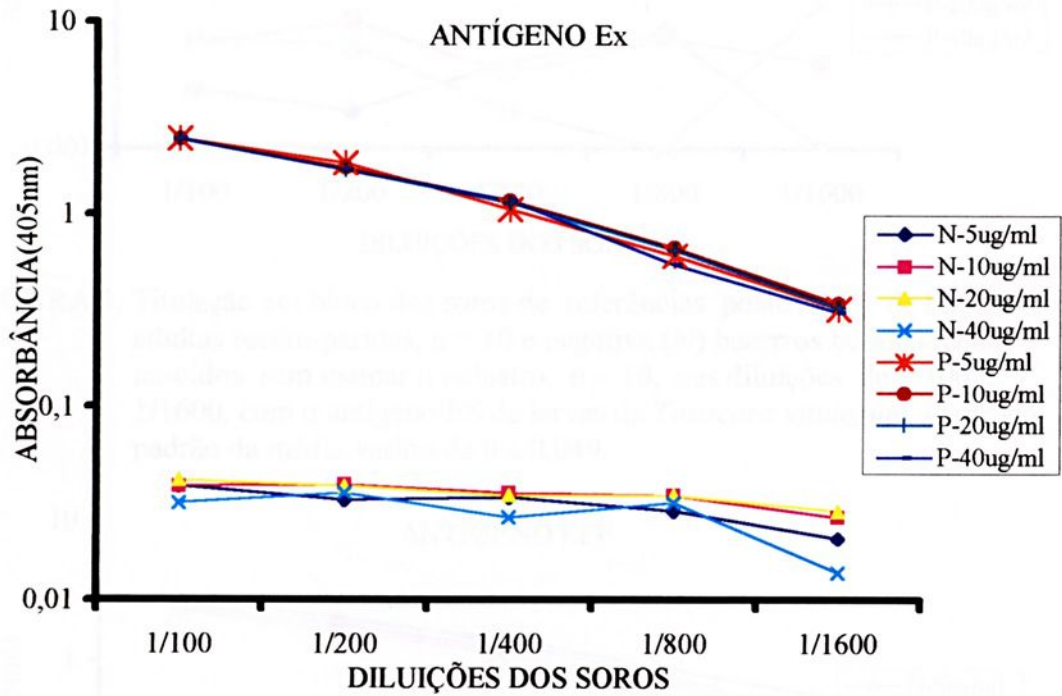


FIGURA 2. Titulação em bloco dos soros de referências positiva (P) de búfalas adultas recém-paridas, n = 10 e negativa (N) de bezerros búfalos recém-nascidos sem mamar o colostro, n = 10, nas diluições de 1/100 a 1/1600, com o antígeno Ex de larvas de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,129.

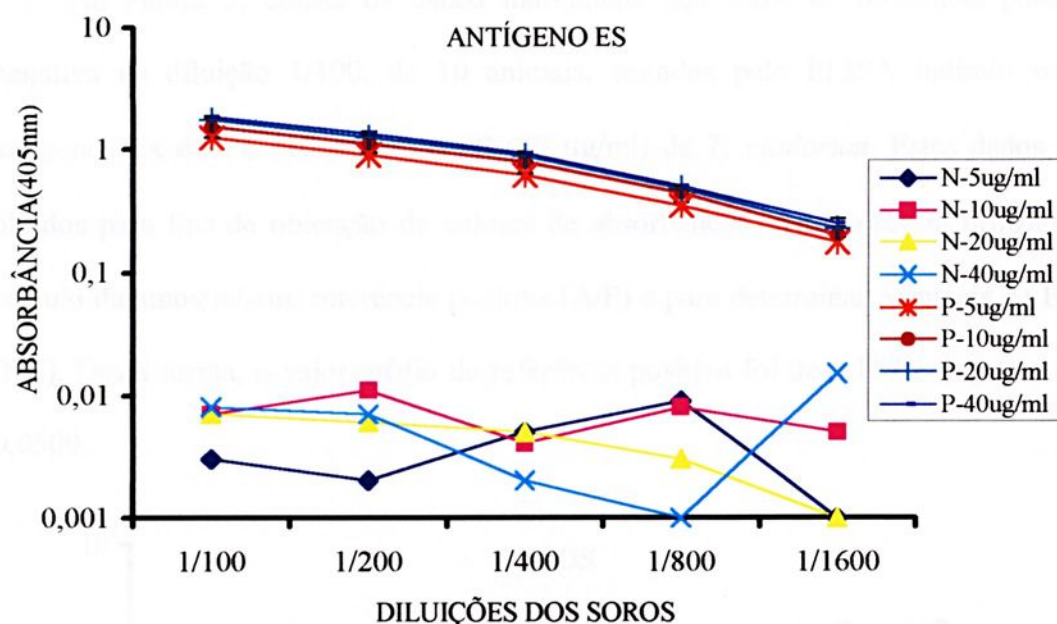


FIGURA 3. Titulação em bloco dos soros de referências positiva (P) de búfalas adultas recém-paridas, $n = 10$ e negativa (N) bezerras búfalos recém-nascidos sem mamar o colostro, $n = 10$, nas diluições de 1/100 a 1/1600, com o antígeno ES de larvas de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,049.

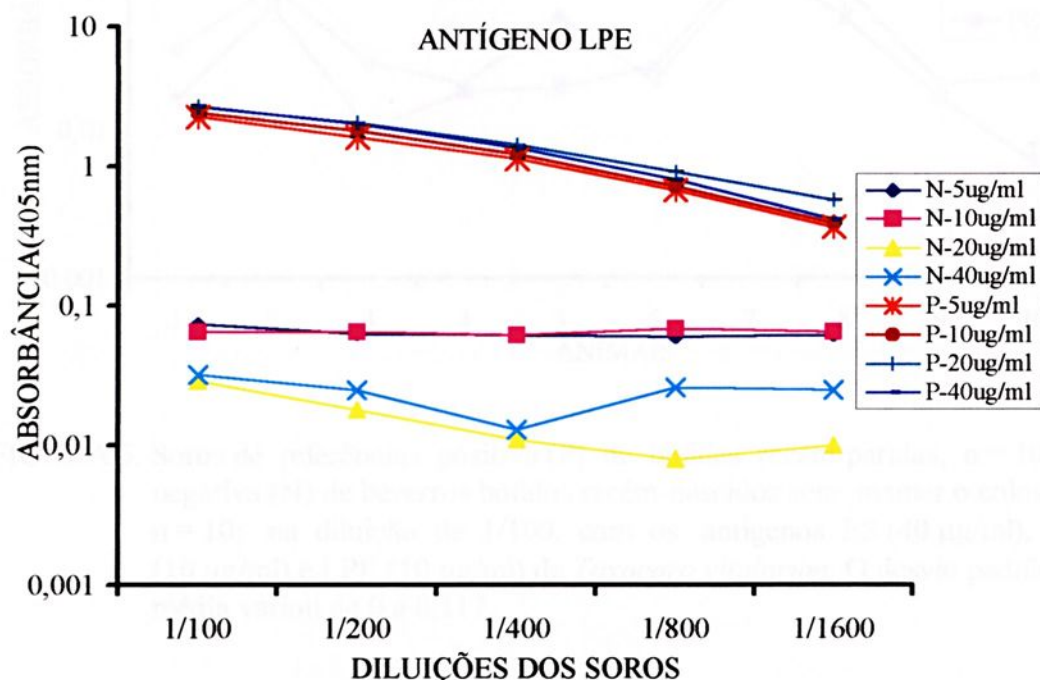


FIGURA 4. Titulação em bloco dos soros de referências positiva (P) de búfalas adultas recém-paridas, $n = 10$ e negativa (N) bezerras búfalos recém-nascidos sem mamar o colostro, $n = 10$, nas diluições de 1/100 a 1/1600, com o antígeno LPE de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,081.

Na Figura 5, consta os dados individuais dos soros de referência positiva e negativa na diluição 1/100, de 10 animais, testados pelo ELISA indireto com os antígenos Ex e LPE (10 µg/ml) e ES (40 µg/ml) de *T. vitulorum*. Estes dados foram obtidos para fins de obtenção de valores de absorbância média a serem utilizados no cálculo da amostra/soro referência positiva (A/P) e para determinar os níveis de ELISA (NE). Desta forma, o valor médio de referência positiva foi de 2,177 e negativa foi de 0,0509.

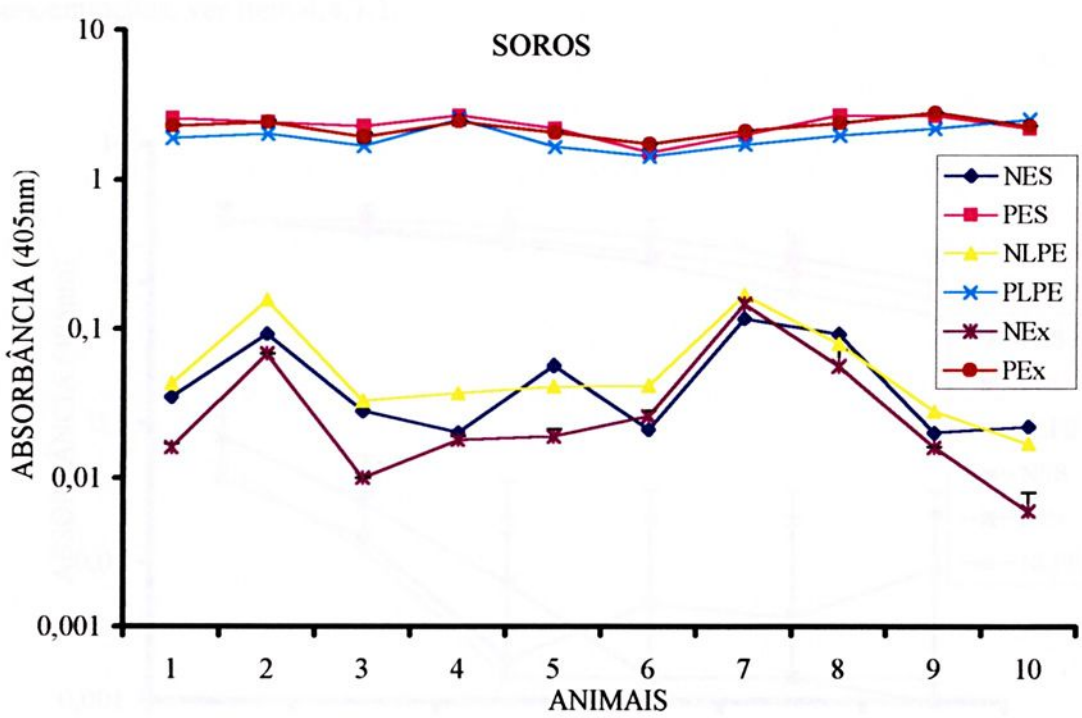


FIGURA 5. Soros de referências positiva (P) de búfalas recém-paridas, n = 10 e negativa (N) de bezerros búfalos recém-nascidos sem mamar o colostro, n = 10; na diluição de 1/100, com os antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,117.

5.2.1.2- Antígenos x colostros

A resposta de reatividade ótima dos antígenos e dos colostros das búfalas foi determinada através da titulação em bloco de colostros de referência positiva e negativa versus antígenos, através do método ELISA indireto.

Os colostros de referência positiva e negativa em diferentes diluições, foram inicialmente testados contra os antígenos Ex ou ES ou LPE em diferentes concentrações, ver Item 4.4.7.1.

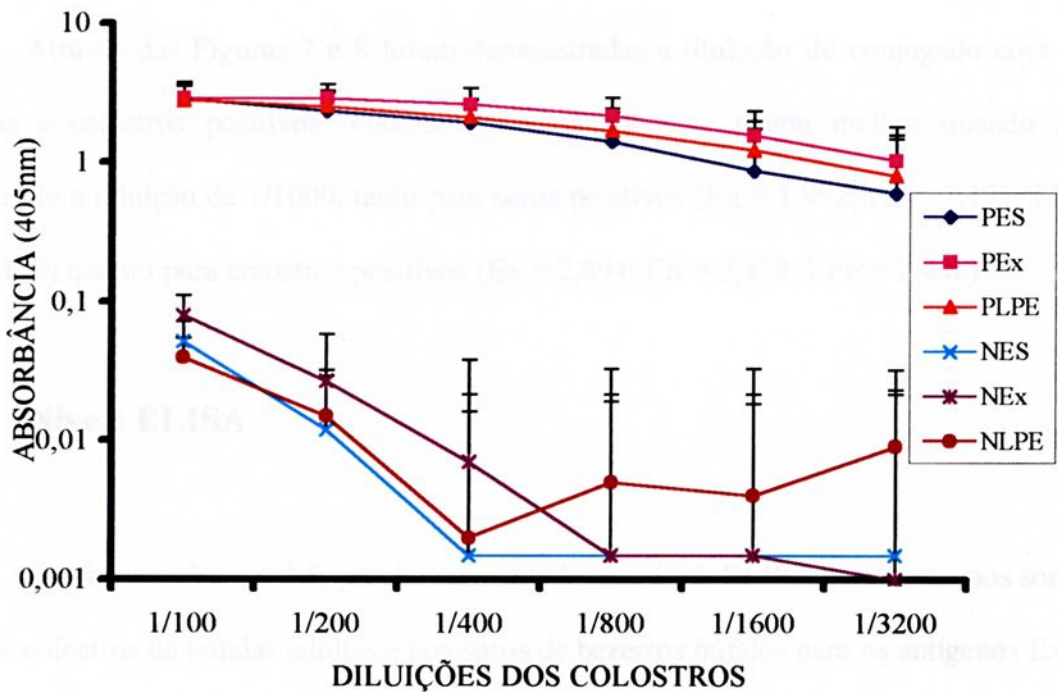


FIGURA 6 Titulação dos colostros de referência positiva (P) de búfalas no período pós-parto, $n = 8$ e negativa (N) de leite de búfalas seis meses pós-parto, $n = 2$; nas diluições de 1/100 a 1/3200, com antígenos ES (40 $\mu\text{g/ml}$), Ex (10 $\mu\text{g/ml}$) e LPE (10 $\mu\text{g/ml}$) de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,133.

Conforme demonstrado na Figura 6, constatou-se, após esta titulação em bloco, que a diluição ideal do colostro de referência positiva, ou seja, aquela que apresentou melhor reatividade foi a de 1/100, obtendo valores em absorbância para o antígeno Ex (10µg/ml) = 2,894; ES (40µg/ml) = 2,888 e LPE (10µg/ml) = 2,794. Já os valores de absorbância dos soros de referência negativa foram para o antígeno Ex (10µg/ml) = 0,052; ES (40µg/ml) = 0,08 e LPE (10µg/ml) = 0,04.

5.2.2 -Titulação do conjugado

Através das Figuras 7 e 8 foram demonstradas a titulação do conjugado com os soros e colostros positivos. Pôde-se perceber que este reagiu melhor quando foi utilizado a diluição de 1/1000, tanto para soros positivos (Ex = 1,992; ES = 1,131; LPE = 1,149) quanto para colostros positivos (Ex = 2,894; ES = 2,438; LPE = 2,498).

5.3 - Níveis ELISA

Conforme o Item 4.4.5, previamente citado, os níveis ELISA detectados nos soros e nos colostros de búfalas adultas e nos soros de bezerros búfalos para os antígenos Ex e ES larvais, bem como para o LPE dos parasitas adultos de *T. vitulorum*, estão evidenciados nas Tabelas 2 a 7.



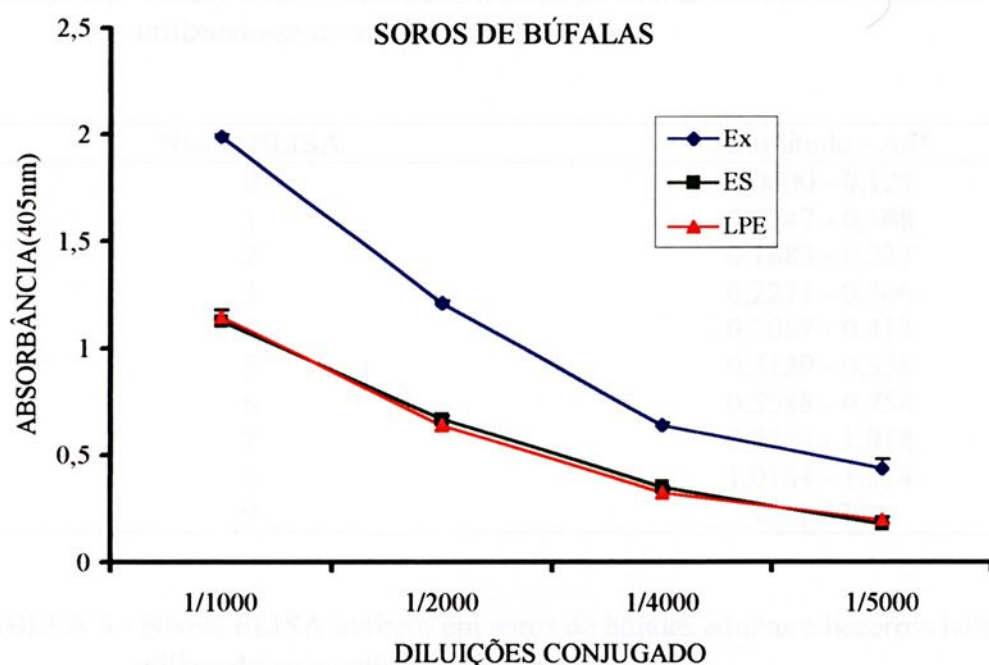


FIGURA 7. Titulação do conjugado (diluições de 1/1000 a 1/5000) com soro de búfalas adultas no perí-parto (diluições 1/100, $n = 1$), com um dia pós-parto na presença dos antígenos ES (40 $\mu\text{g/ml}$), Ex (10 $\mu\text{g/ml}$) e LPE (10 $\mu\text{g/ml}$) de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0,002 a 0,049.

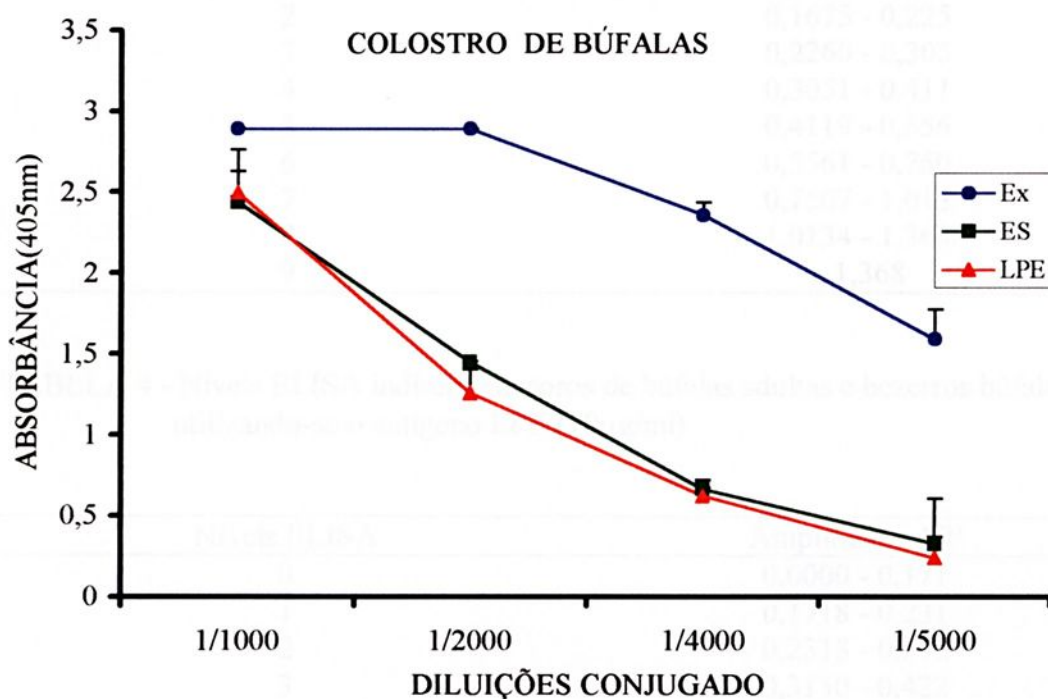


FIGURA 8. Titulação do conjugado (diluições de 1/1000 a 1/5000) com colostro de Búfalas adultas no perí-parto (diluições 1/100, $n = 1$) e com um dia pós-parto na presença dos antígenos ES (40 $\mu\text{g/ml}$), Ex (10 $\mu\text{g/ml}$) e LPE (10 $\mu\text{g/ml}$) de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0 a 0,325

TABELA 2 - Níveis ELISA indireto em soros de búfalas adultas e de bezerros búfalos utilizando-se o antígeno Ex (10µg/ml)

Níveis ELISA	Amplitude - A/P
0	0,0000 - 0,124
1	0,1247 - 0,168
2	0,1683 - 0,227
3	0,2271 - 0,306
4	0,3067 - 0,413
5	0,4139 - 0,558
6	0,5588 - 0,754
7	0,7544 - 1,018
8	1,0184 - 1,374
9	> 1,374

TABELA 3 - Níveis ELISA indireto em soros de búfalas adultas e bezerros búfalos utilizando-se o antígeno ES (40µg/ml)

Níveis ELISA	Amplitude - A/P
0	0,0000 - 0,124
1	0,1250 - 0,167
2	0,1675 - 0,225
3	0,2260 - 0,305
4	0,3051 - 0,411
5	0,4119 - 0,556
6	0,5561 - 0,750
7	0,7507 - 1,013
8	1,0134 - 1,368
9	> 1,368

TABELA 4 - Níveis ELISA indireto em soros de búfalas adultas e bezerros búfalos utilizando-se o antígeno LPE (10µg/ml)

Níveis ELISA	Amplitude - A/P
0	0,0000 - 0,171
1	0,1718 - 0,231
2	0,2318 - 0,312
3	0,3130 - 0,422
4	0,4225 - 0,570
5	0,5704 - 0,769
6	0,7700 - 1,039
7	1,0394 - 1,403
8	1,4032 - 1,894
9	> 1,894

TABELA 5 - Níveis ELISA indireto em colostros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno ES (40µg/ml)

Níveis ELISA	Amplitude - A/P
0	0,0000 - 0,138
1	0,1382 - 0,186
2	0,1865 - 0,251
3	0,2518 - 0,339
4	0,3399 - 0,458
5	0,4589 - 0,619
6	0,6195 - 0,836
7	0,8363 - 1,128
8	1,1290 - 1,524
9	> 1,524

TABELA 6 - Níveis ELISA indireto em colostros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno Ex (10µg/ml)

Níveis ELISA	Amplitude - A/P
0	0,0000 - 0,106
1	0,1068 - 0,144
2	0,1442 - 0,194
3	0,1947 - 0,262
4	0,2628 - 0,354
5	0,3548 - 0,478
6	0,4789 - 0,646
7	0,6465 - 0,872
8	0,8728 - 1,178
9	> 1,178

TABELA 7 - Níveis ELISA indireto em colostros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno LPE (10µg/ml)

Níveis ELISA	Amplitude - A/P
0	0,0000 - 0,078
1	0,0783 - 0,105
2	0,1057 - 0,142
3	0,1427 - 0,192
4	0,1927 - 0,260
5	0,2601 - 0,351
6	0,3511 - 0,473
7	0,4739 - 0,639
8	0,6398 - 0,863
9	> 0,863

Resalta-se que os soros e os colostros foram considerados positivos, somente quando os valores A/P calculados apresentaram níveis ELISA, NE maior ou igual a quatro.

5.4 - Resposta imune humoral

5.4.1-Búfalas adultas

As respostas imune humorais observadas nos soros das búfalas adultas em relação aos 3 antígenos utilizados, podem ser visualizadas pelas Tabelas 8, 9 e 10 e pelas Figuras 9 e 10, nas quais contêm os valores médios de A/P e os níveis ELISA dos animais analisados no período de 365 dias pós-parto.

Para analisar os dados da Tabela 8, verificou-se pouca variação nos níveis ELISA dos soros das búfalas adultas, durante o período de 1 a 365 dias pós-parto. Observou-se pouca variação durante o período de 106 a 130 dias pós-parto. Entre 106 e 130 dias pós-parto, as búfalas adultas apresentaram níveis ELISA de anticorpos anti-Fx de 7, considerando durante todo o período analisado. Estes anticorpos apresentaram valores A/P variando de $0,0005 \pm 0,0003$ a $1,0009 \pm 0,0776$ e níveis ELISA de 7 e 8.

A análise de variância mostrou diferenças estatísticas entre os dados dos soros de búfalas adultas frente ao antígeno larval Fx de *T. vivitorum* foi de 2,33%. A Figura

TABELA 8 – Valores de A/P , níveis de ELISA obtido em soros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno Ex (10 µg/ml), através do método ELISA indireto.

Dias Pós-parto	N.º de animais	Valores A/P		Níveis ELISA
		Amplitude	Média $\pm$ DP	
01	10	0,7115 - 1,2729	0,9986 $\pm$ 0,1896	7
2-7	12	0,7659 - 1,1869	0,8990 $\pm$ 0,1372	7
8-15	10	0,7297 - 0,9696	0,8605 $\pm$ 0,0808	7
16-30	10	0,5984 - 1,2955	0,9732 $\pm$ 0,1853	7
31-45	11	0,8111 - 1,1416	0,9626 $\pm$ 0,1074	7
46-60	10	0,8066 - 1,0420	0,9447 $\pm$ 0,0707	7
61-75	10	0,8836 - 1,0556	0,9632 $\pm$ 0,0528	7
76-90	07	0,7704 - 1,2050	0,9748 $\pm$ 0,1664	7
91-105	10	0,5078 - 1,1507	0,9316 $\pm$ 0,1768	7
106-120	06	0,9153 - 1,1959	1,0480 $\pm$ 0,1023	8
121-135	10	0,8428 - 1,1099	0,9746 $\pm$ 0,0929	7
136-150	04	1,0058 - 1,1823	1,1009 $\pm$ 0,0776	8
151-165	10	0,8066 - 1,2231	0,9714 $\pm$ 0,1075	7
166-180	06	0,7297 - 1,1371	0,9801 $\pm$ 0,1591	7
181-210	11	0,8564 - 1,2729	1,0132 $\pm$ 0,1401	7
211-241	11	0,7794 - 1,1688	0,9601 $\pm$ 0,1039	7
242-272	10	0,8021 - 1,1597	0,9886 $\pm$ 0,0992	7
273-303	10	0,8700 - 1,2593	1,0013 $\pm$ 0,1244	7
304-334	11	0,7297 - 1,2050	0,9523 $\pm$ 0,1233	7
335-365	07	0,8971 - 1,1733	1,0375 $\pm$ 0,1029	8

D.P = Desvio Padrão

Pelos resultados da Tabela 8, verifica-se pouca variação nos níveis ELISA dos soros das búfalas adultas durante o período de 1 a 365 dias pós-parto. Observa-se apenas uma discreta oscilação entre os períodos de 106 a 150 dias pós-parto. Estes dados indicam que as búfalas adultas apresentaram altos níveis de anticorpos anti-Ex de *T. vitulorum* durante todo o período analisado. Estes animais apresentaram valores A/P, variando de 0,8605 $\pm$ 0,00808 a 1,1009 $\pm$ 0,0776 e níveis ELISA de 7 e 8.

O coeficiente de variação encontrado conforme os resultados dos soros de búfalas adultas frente ao antígeno larval Ex de *T. vitulorum* foi de 2,57%. A Figura

18 apresenta placa da reação ELISA dos soros das búfalas adultas com antígeno Ex larval de *T. vitulorum*.

TABELA 9 – Valores de A/P, níveis de ELISA obtido em soros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno ES (40µg/ml), através do método ELISA indireto.

Dias Pós-parto	N.º de animais	Valores A/P		Níveis ELISA
		Amplitude	Média $\pm$ DP	
01	10	0,6114 – 1,2537	1,0056 $\pm$ 0,2312	7
2-7	12	0,5806 – 1,2053	0,9366 $\pm$ 0,1691	7
8-15	10	0,7830 – 1,1921	0,9669 $\pm$ 0,1269	7
16-30	10	0,7654 – 1,2537	1,0439 $\pm$ 0,1440	8
31-45	11	0,8578 – 1,1261	0,9881 $\pm$ 0,0874	7
46-60	10	0,7390 – 1,1041	0,9510 $\pm$ 0,1271	7
61-75	10	0,7830 – 1,2097	0,9748 $\pm$ 0,1238	7
76-90	07	0,6554 – 1,2317	0,9923 $\pm$ 0,1788	7
91-105	10	0,6334 – 1,1613	0,9897 $\pm$ 0,1635	7
106-120	06	1,0425 – 1,2493	1,1408 $\pm$ 0,0875	8
121-135	10	0,8402 – 1,2493	1,1248 $\pm$ 0,1401	8
136-150	04	1,1041 – 1,2493	1,1822 $\pm$ 0,0757	8
151-165	10	0,8314 – 1,2493	1,1332 $\pm$ 0,1348	8
166-180	06	0,8754 – 1,2141	1,0799 $\pm$ 0,1577	8
181-210	11	0,9282 – 1,2493	1,1665 $\pm$ 0,1003	8
211-241	11	0,9194 – 1,2493	1,1365 $\pm$ 0,1083	8
242-272	10	0,8006 – 1,2361	1,1015 $\pm$ 0,1262	8
273-303	10	0,8094 – 1,2185	1,0496 $\pm$ 0,1341	8
304-334	11	0,7434 – 1,2097	1,0461 $\pm$ 0,1535	8
335-365	07	0,8798 – 1,2361	1,1381 $\pm$ 0,1321	8

D.P = Desvio Padrão

Observa-se na Tabela 9, pequena oscilação dos níveis de anticorpos anti-ES no período de 1 a 105 dias pós-parto, seguindo por um nível constante entre 106 a 365 dias pós-parto. Da mesma forma que para o antígeno Ex, o antígeno ES reagiu fortemente com o anticorpo anti-ES de larvas de *T. vitulorum*. Os níveis ELISA variaram somente de 7 a 8 e os valores A/P de 0,9366 $\pm$ 0,1691 a 1,1822 $\pm$ 0,0757.

O coeficiente de variação encontrado conforme os resultados dos soros de búfalas adultas frente ao antígeno larval ES de *T. vitulorum* foi de 2,42%.

TABELA 10 – Valores de A/P , níveis de ELISA obtido em soros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno LPE(10 µg /ml), através do método ELISA indireto

Dias Pós-parto	N.º de animais	Valores A/P		Níveis ELISA
		Amplitude	Média $\pm$ DP	
01	10	0,5928 - 1,4933	1,0799 $\pm$ 0,3234	7
2-7	12	0,8035 - 1,4723	1,0031 $\pm$ 0,2212	6
8-15	10	0,8193 - 1,2406	0,9772 $\pm$ 0,1331	6
16-30	10	0,5928 - 1,4881	1,1073 $\pm$ 0,2646	7
31-45	11	0,9562 - 1,4407	1,1984 $\pm$ 0,1825	7
46-60	10	0,8719 - 1,2564	1,0599 $\pm$ 0,1308	7
61-75	10	0,9246 - 1,1616	1,0431 $\pm$ 0,0803	7
76-90	07	0,7877 - 1,3248	1,0901 $\pm$ 0,1764	7
91-105	10	0,5086 - 1,2616	0,9999 $\pm$ 0,2220	6
106-120	06	0,9509 - 1,4512	1,1537 $\pm$ 0,1989	7
121-135	10	0,9088 - 1,4407	1,0699 $\pm$ 0,1516	7
136-150	04	1,0826 - 1,2827	1,1550 $\pm$ 0,0879	7
151-165	10	0,8351 - 1,3406	1,0283 $\pm$ 0,1690	6
166-180	06	0,8298 - 1,2037	1,0641 $\pm$ 0,1391	7
181-210	11	0,8772 - 1,3354	1,0452 $\pm$ 0,1495	7
211-241	11	0,8719 - 1,3933	1,0807 $\pm$ 0,1494	7
242-272	10	0,9983 - 1,3512	1,1315 $\pm$ 0,1123	7
273-303	10	0,9299 - 1,3301	1,1094 $\pm$ 0,1446	7
304-334	11	0,9404 - 1,4407	1,1266 $\pm$ 0,1640	7
335-365	07	0,9246 - 1,3459	1,0954 $\pm$ 0,1333	7

D.P = Desvio Padrão

Através da Tabela 10, evidencia-se a presença de anticorpos anti-LPE de parasitas adultos de *T. vitulorum* nos soros das búfalas, desde 1 a 365 dias pós-parto. Os valores A/P variando de $0,9772 \pm 0,1331$ a $1,1984 \pm 0,1825$ e níveis ELISA de 6 a 7, foram levemente inferiores aos observados nas reações com os antígenos Ex e ES. Ressalta-se ainda, que os antígenos Ex e ES foram obtidos a partir de larvas infectantes, portanto mais adequados para detectar anticorpos durante a fase migratória das larvas nos tecidos maternos.

O coeficiente de variação encontrado conforme os resultados dos soros de búfalas adultas frente ao antígeno LPE foi de 2,83%.

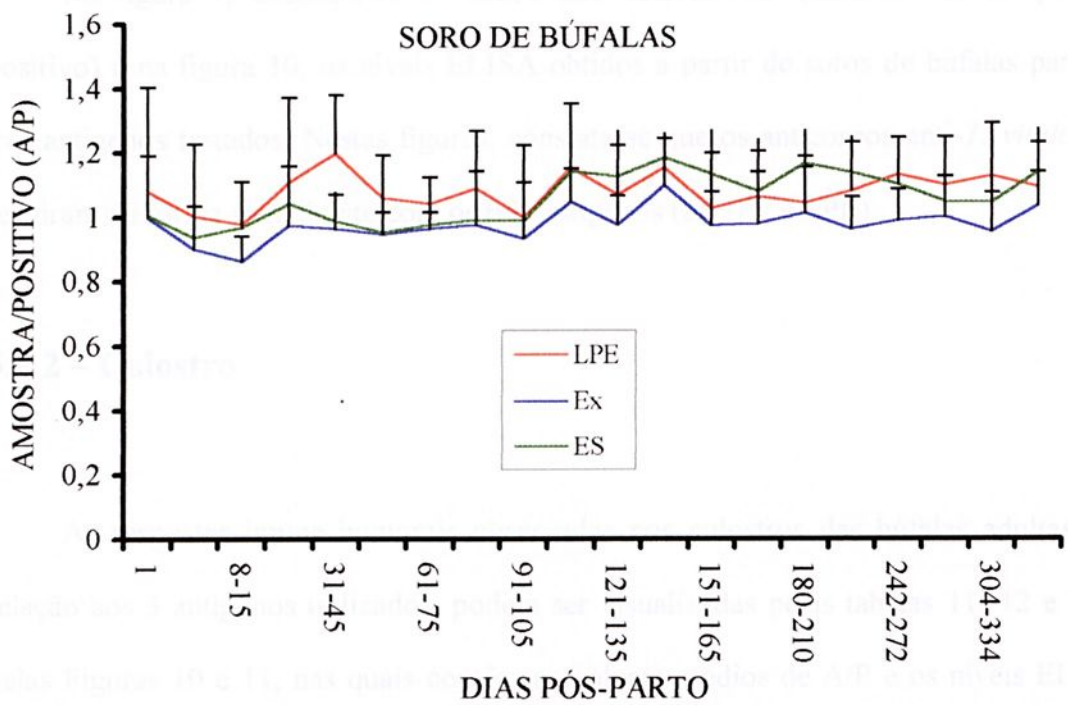


FIGURA 9. Valores da amostra em relação ao positivo (A/P) de soros de búfalas adultas no período de 1 a 365 dias pós-parto (n = 4 a 12), utilizando-se o antígeno ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de 0,07 a 0,323.

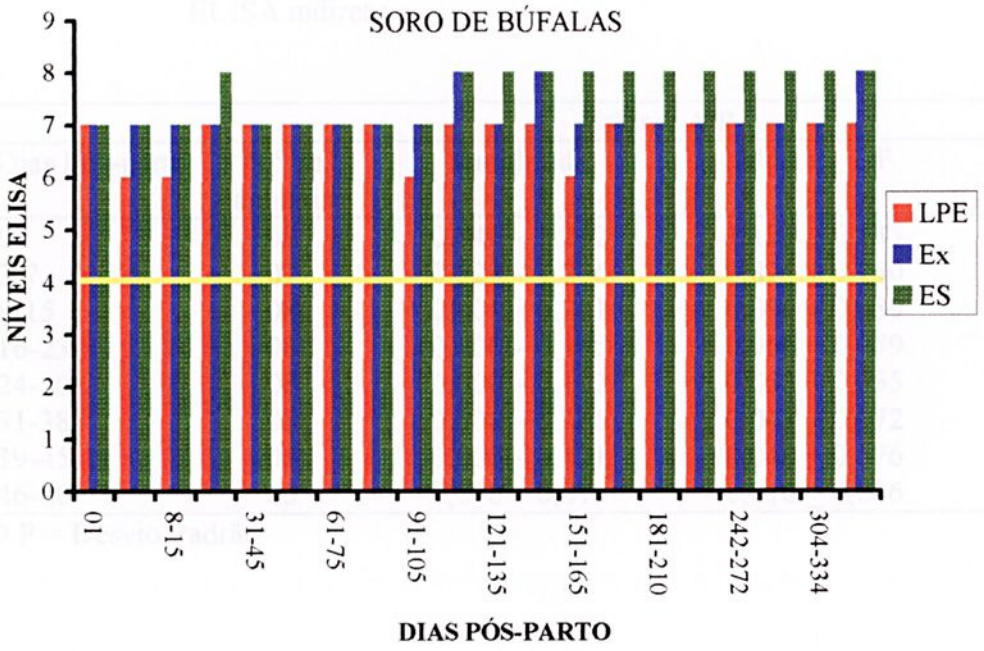


FIGURA 10. Níveis ELISA (NE) dos soros de búfalas adultas no período de 1 a 365 dias pós-parto (n = 4 a 12), com antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*, no nível quatro está representado o ponto de corte.

Na figura 9, encontra-se os dados dos valores A/P (amostra em relação ao positivo) e na figura 10, os níveis ELISA obtidos a partir de soros de búfalas para os três antígenos testados. Nestas figuras, constata-se que os anticorpos anti-*T. vitulorum* reagiram de forma semelhante com os três antígenos (ES, Ex e LPE).

5.4.2 – Colostro

As respostas imune humorais observadas nos colostros das búfalas adultas em relação aos 3 antígenos utilizados, podem ser visualizadas pelas tabelas 11, 12 e 13 e pelas Figuras 10 e 11, nas quais contêm os valores médios de A/P e os níveis ELISA dos animais analisados no período de 60 dias pós parto.

TABELA 11 – Valores de A/P , níveis de ELISA obtido em colostros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno Ex (10 µg /ml), através do método ELISA indireto

Dias Pós-parto	N.º de animais	Valores A/P		Níveis ELISA
		Amplitude	Média ± DP	
01	08	0,840 – 1,242	1,121 ± 0,133	8
2-7	07	0,523 – 1,206	0,821 ± 0,250	7
8-15	08	0,001 – 0,261	0,096 ± 0,089	0
16-23	08	0,000 – 0,195	0,065 ± 0,079	0
24-30	08	0,000 – 0,102	0,033 ± 0,055	0
31-38	08	0,000 – 0,206	0,043 ± 0,072	0
39-45	05	0,000 – 0,171	0,040 ± 0,076	0
46-60	05	0,000 – 0,074	0,016 ± 0,036	0

D.P = Desvio Padrão

TABELA 12 – Valores de A/P , níveis de ELISA obtido em colostros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno ES (40 µg /ml), através do método ELISA indireto

Dias Pós-parto	N.º de animais	Valores A/P		
		Amplitude	Média $\pm$ DP	Níveis ELISA
01	08	0,745 – 1,100	0,999 $\pm$ 0,122	7
2-7	07	0,415 – 1,065	0,733 $\pm$ 0,243	6
8-15	08	0,014 – 0,183	0,100 $\pm$ 0,058	0
16-23	08	0,000 – 0,025	0,076 $\pm$ 0,106	0
24-30	08	0,000 – 0,083	0,022 $\pm$ 0,034	0
31-38	08	0,000 – 0,127	0,030 $\pm$ 0,061	0
39-45	05	0,000 – 0,160	0,027 $\pm$ 0,074	0
46-60	05	0,000 – 0,091	0,013 $\pm$ 0,047	0

D.P = Desvio Padrão

TABELA 13 – Valores de A/P , níveis de ELISA obtido em colostros de búfalas adultas utilizando-se o antígeno LPE(10 µg /ml), através do método ELISA indireto

Dias Pós-parto	N.º de animais	Valores A/P		
		Amplitude	Média $\pm$ DP	Níveis ELISA
01	08	0,764 – 1,204	0,893 $\pm$ 0,106	9
2-7	07	0,497 – 0,988	0,715 $\pm$ 0,182	8
8-15	08	0,045 – 0,306	0,128 $\pm$ 0,093	2
16-23	08	0,026 – 0,231	0,092 $\pm$ 0,068	1
24-30	08	0,000 – 0,165	0,062 $\pm$ 0,062	0
31-38	08	0,005 – 0,212	0,058 $\pm$ 0,070	0
39-45	05	0,000 – 0,116	0,038 $\pm$ 0,046	0
46-60	05	0,000 – 0,094	0,026 $\pm$ 0,039	0

D.P = Desvio Padrão

Através dos resultados apresentados nas Tabelas 10 a 13 e Figuras 11 e 12, constata-se que o colostro das búfalas apresentaram-se reativos ao ELISA indireto com altos níveis de anticorpos IgG anti-ES, Ex e LPE de *T. vitulorum* na primeira semana pós-parto. Em seguida, ocorreu um rápido declínio na concentração destes anticorpos, onde os anticorpos anti-Ex e ES foram detectados no nível ELISA zero já

a partir da terceira semana pós-parto (Tabelas 11 e 12). O anti-LPE, por outro lado, ainda permaneceu nos níveis 2 e 1 na terceira e na quarta semana, respectivamente, para em seguida zerar na quinta semana pós-parto (Tabela 13).

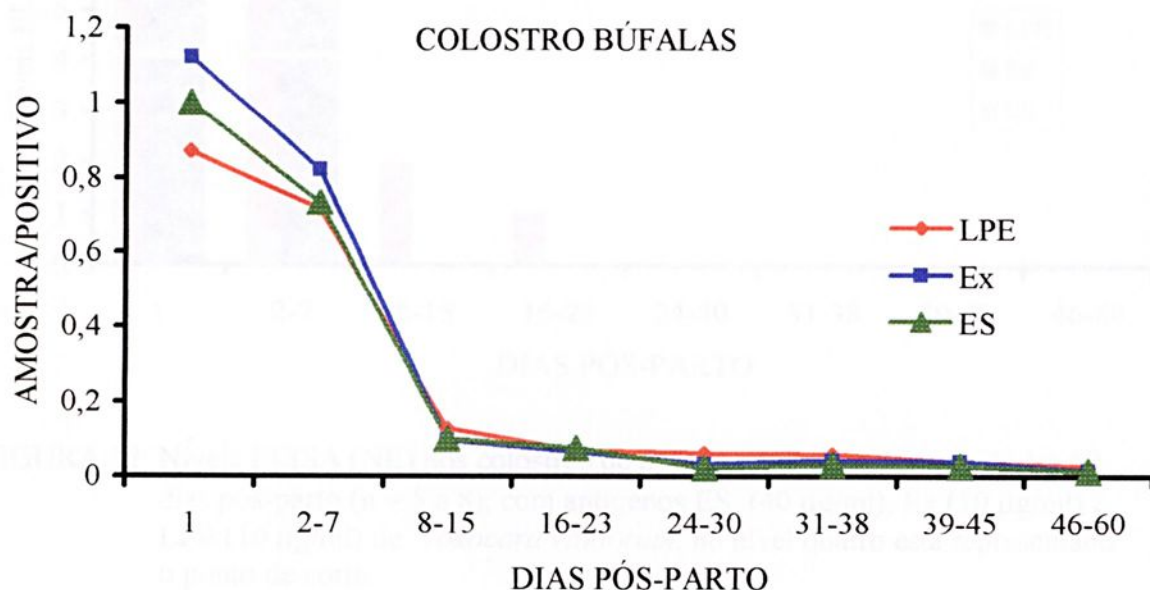


FIGURA 11. Valores da amostra em relação ao positivo (A/P) de colostros de búfalas adultas no período de 1 a 60 dias pós-parto ($n = 5$ a 8), utilizando-se o antígeno ES($40\mu\text{g/ml}$), Ex ($10\mu\text{g/ml}$) e LPE ($10\mu\text{g/ml}$) de *Toxocara vitulorum*. O desvio padrão da média variou de $0,036$ a $0,298$.

É apresentada pela Figura 20, a placa com a reação dos colostros das búfalas adultas com o antígeno larval Ex de *T. vitulorum*.

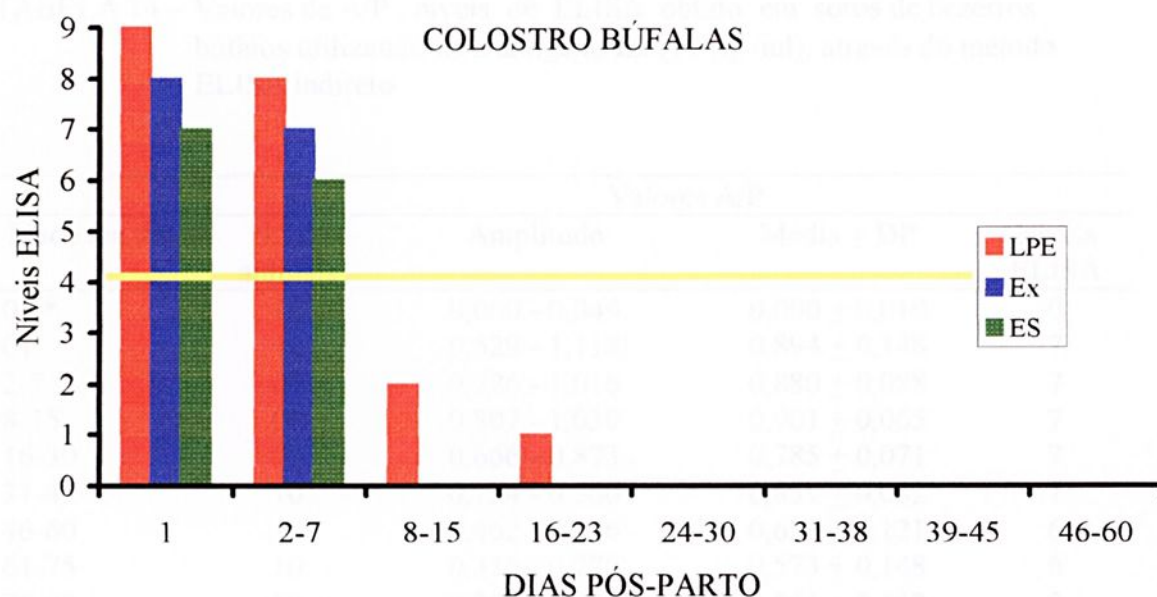


FIGURA 12. Níveis ELISA (NE) dos colostros de búfalas adultas no período de 1 a 60 dias pós-parto ($n = 5$ a 8), com antígenos ES ($40 \mu\text{g/ml}$), Ex ($10 \mu\text{g/ml}$) e LPE ($10 \mu\text{g/ml}$) de *Toxocara vitulorum*, no nível quatro está representado o ponto de corte.

5.4.3 - Bezerros búfalos

As respostas imune humorais observadas nos soros dos bezerros búfalos em relação aos 3 antígenos utilizados, podem ser visualizadas pelas tabelas 14, 15 e 16 e pelas Figuras 12 e 13, nas quais contêm os valores médios de A/P e os níveis ELISA dos animais analisados no período de 365 dias de vida.

TABELA 14 – Valores de A/P , níveis de ELISA obtido em soros de bezerros búfalos utilizando-se o antígeno Ex (10 µg /ml), através do método ELISA indireto

Idade em dias	N.º de animais	Valores A/P		Níveis ELISA
		Amplitude	Média $\pm$ DP	
01 *	10	0,000 - 0,049	0,000 $\pm$ 0,019	0
01	10	0,529 - 1,118	0,894 $\pm$ 0,148	7
2-7	09	0,726 - 1,016	0,880 $\pm$ 0,088	7
8-15	09	0,807 - 1,030	0,901 $\pm$ 0,065	7
16-30	09	0,666 - 0,873	0,785 $\pm$ 0,071	7
31-45	10	0,724 - 0,966	0,839 $\pm$ 0,082	7
46-60	10	0,462 - 0,766	0,636 $\pm$ 0,121	6
61-75	10	0,316 - 0,770	0,573 $\pm$ 0,148	6
76-90	10	0,290 - 0,807	0,555 $\pm$ 0,162	5
91-105	10	0,243 - 1,045	0,481 $\pm$ 0,227	5
106-120	10	0,191 - 0,660	0,440 $\pm$ 0,149	5
121-135	10	0,219 - 0,595	0,429 $\pm$ 0,132	5
136-150	10	0,195 - 0,476	0,348 $\pm$ 0,092	4
151-165	08	0,329 - 0,678	0,438 $\pm$ 0,120	5
166-180	08	0,208 - 0,674	0,435 $\pm$ 0,147	5
181-210	10	0,205 - 0,820	0,439 $\pm$ 0,199	5
211-241	10	0,357 - 0,827	0,566 $\pm$ 0,175	6
242-272	10	0,268 - 0,958	0,559 $\pm$ 0,218	6
273-303	08	0,362 - 0,941	0,627 $\pm$ 0,190	6
304-334	07	0,411 - 0,929	0,606 $\pm$ 0,192	6
335-365	08	0,458 - 0,777	0,649 $\pm$ 0,125	6

D.P = Desvio Padrão. 01*- Bezerros recém-nascidos sem mamar colostro

Conforme os resultados visualizados na Tabela 14 e Figuras 13 e 14, observa-se que no dia do nascimento, os bezerros búfalos que não mamaram o colostro materno apresentaram-se desprovidos de anticorpos IgG anti-Ex de *T. vitulorum* (A/P = 0,000 e nível ELISA = 0). Após o recebimento do mesmo, estes animais apresentaram valores máximos desse anticorpo, com níveis ELISA 7 e valores A/P de 0,894 $\pm$ 0,148. Estes valores permaneceram-se altos até 31 a 45 dias, declinaram levemente de 46 a 210 dias; aumentando novamente a partir de 211 dias de idade. O coeficiente de variação encontrado conforme os resultados dos soros de bezerros búfalos frente ao antígeno larval Ex de *T. vitulorum* foi de 2,74%.

TABELA 15 – Valores de A/P , níveis de ELISA obtido em soros de bezerros búfalos utilizando-se o antígeno ES (40 µg /ml), através do método ELISA indireto

Idade em dias	N.º de animais	Valores A/P		Níveis ELISA
		Amplitude	Média $\pm$ DP	
01*	10	0,000 - 0,029	0,000 $\pm$ 0,016	0
01	10	0,303 - 1,003	0,798 $\pm$ 0,191	7
2-7	09	0,504 - 0,942	0,721 $\pm$ 0,130	6
8-15	09	0,639 - 0,871	0,731 $\pm$ 0,075	6
16-30	09	0,384 - 0,814	0,580 $\pm$ 0,128	6
31-45	10	0,441 - 0,859	0,626 $\pm$ 0,131	6
46-60	10	0,256 - 0,618	0,475 $\pm$ 0,118	5
61-75	10	0,174 - 0,542	0,399 $\pm$ 0,131	4
76-90	10	0,156 - 0,460	0,338 $\pm$ 0,098	4
91-105	10	0,130 - 0,694	0,321 $\pm$ 0,179	4
106-120	10	0,063 - 0,381	0,280 $\pm$ 0,116	3
121-135	10	0,077 - 0,346	0,226 $\pm$ 0,087	3
136-150	10	0,077 - 0,261	0,195 $\pm$ 0,065	2
151-165	08	0,175 - 0,282	0,224 $\pm$ 0,033	2
166-180	08	0,166 - 0,292	0,238 $\pm$ 0,044	3
181-210	10	0,143 - 0,333	0,247 $\pm$ 0,061	3
211-241	10	0,228 - 0,643	0,347 $\pm$ 0,129	4
242-272	10	0,137 - 0,504	0,326 $\pm$ 0,116	4
273-303	08	0,220 - 0,389	0,332 $\pm$ 0,069	4
304-334	07	0,237 - 0,438	0,340 $\pm$ 0,096	4
335-365	08	0,304 - 0,508	0,388 $\pm$ 0,064	4

D.P = Desvio Padrão. 01*- Bezerros recém-nascidos sem mamar o colostro

Já a Tabela 15 e Figuras 13 e 14 demonstram que os níveis ELISA e os valores A/P do antígeno ES larval, embora levemente inferiores, assemelham-se aos obtidos para o antígeno Ex. Os anticorpos da classe IgG séricos anti-ES encontram-se em níveis ELISA = 0 antes dos animais mamarem o colostro, mas atingiram valores máximos imediatamente após o recebimento deste. Os valores A/P para este antígeno variou de $0,195 \pm 0,065$ a $0,789 \pm 0,191$ e níveis ELISA de 2 a 7. A placa da reação dos soros dos bezerros búfalos com o antígeno larval ES de *T. vitulorum* está apresentada na Figura 19. O coeficiente de variação, conforme os resultados dos soros de bezerros búfalos frente ao antígeno larval ES de *T. vitulorum* foi de 1,78%.

TABELA 16 – Valores de A/P , níveis de ELISA obtido em soros de bezerros búfalos utilizando-se o antígeno LPE (10 µg /ml), através do método ELISA indireto

Idade em dias	N.º de animais	Valores A/P		
		Amplitude	Média $\pm$ DP	Níveis ELISA
01 *	10	0,000 - 0,054	0,000 $\pm$ 0,028	0
01	10	0,857 - 1,129	0,907 $\pm$ 0,143	6
2-7	09	0,819 - 1,092	0,921 $\pm$ 0,104	6
8-15	09	0,724 - 1,012	0,813 $\pm$ 0,090	6
16-30	09	0,719 - 0,946	0,812 $\pm$ 0,074	6
31-45	10	0,622 - 0,925	0,814 $\pm$ 0,088	6
46-60	10	0,439 - 0,797	0,634 $\pm$ 0,133	5
61-75	10	0,365 - 0,699	0,578 $\pm$ 0,133	5
76-90	10	0,354 - 0,677	0,517 $\pm$ 0,117	4
91-105	10	0,371 - 0,836	0,608 $\pm$ 0,170	5
106-120	10	0,000 - 0,898	0,685 $\pm$ 0,259	5
121-135	10	0,485 - 0,839	0,664 $\pm$ 0,101	5
136-150	10	0,579 - 0,838	0,653 $\pm$ 0,078	5
151-165	08	0,501 - 0,750	0,605 $\pm$ 0,091	5
166-180	08	0,491 - 0,782	0,628 $\pm$ 0,116	5
181-210	10	0,400 - 0,926	0,607 $\pm$ 0,176	5
211-241	10	0,516 - 1,282	0,766 $\pm$ 0,222	5
242-272	10	0,406 - 1,152	0,671 $\pm$ 0,242	5
273-303	08	0,435 - 0,958	0,691 $\pm$ 0,188	5
304-334	07	0,447 - 1,029	0,731 $\pm$ 0,202	5
335-365	08	0,743 - 0,985	0,850 $\pm$ 0,084	6

D.P = Desvio Padrão. 01*- Bezerros recém-nascidos sem mamar colostro

Através da Tabela 16 e Figuras 13 e 14, pode-se evidenciar novamente o nível ELISA = 0 para anticorpos IgG séricos anti-LPE de animais recém nascidos sem acesso ao colostro. Após o recebimento do colostro, a resposta sorológica dos bezerros búfalos foi semelhante à obtida para os outros antígenos (Ex e ES), obtendo nível ELISA = 6 nos primeiros 45 dias e novamente aos 365 dias de idade.

O coeficiente de variação encontrado conforme os resultados dos soros de bezerros búfalos frente ao antígeno LPE de parasita adulto de *T. vitulorum* foi de 2,32%.

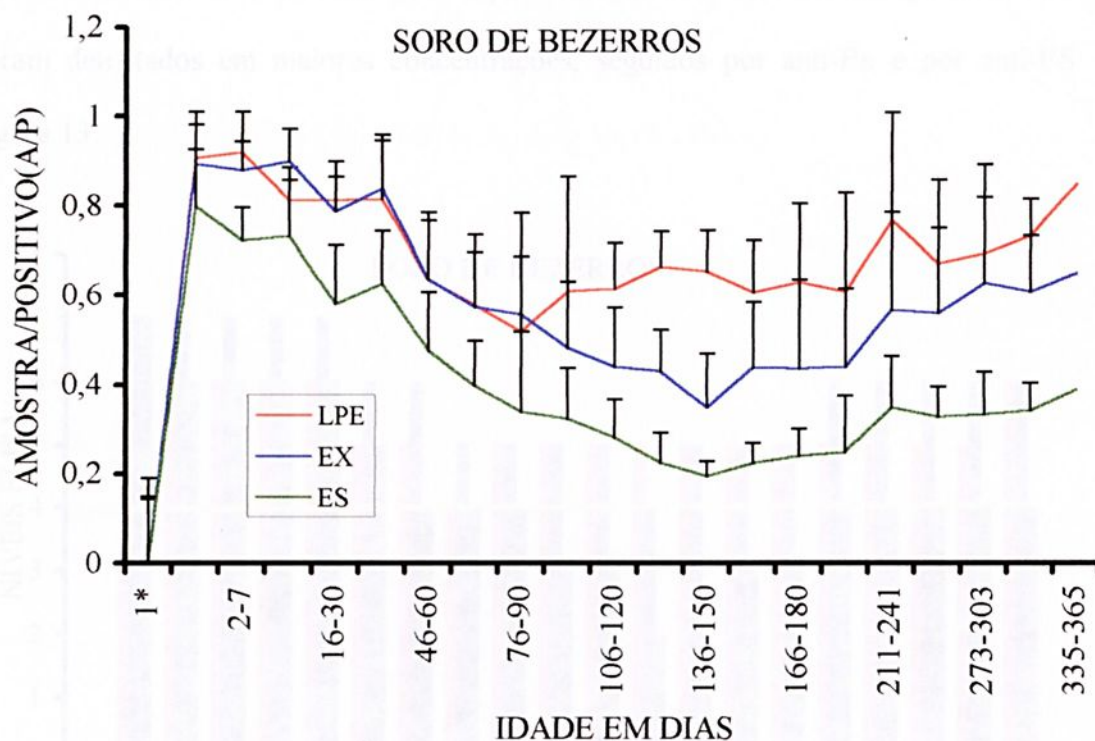


FIGURA 13. Valores da amostra em relação ao positivo (A/P) dos soros de bezerros búfalos no período de 1 a 365 dias após o nascimento ($n = 7$ a 10), utilizando-se o antígeno ES($40 \mu\text{g/ml}$), Ex($10 \mu\text{g/ml}$) e LPE($10 \mu\text{g/ml}$) de *Toxocara vitulorum*. $1^* = 1$ dia de vida sem mamar o colostro. O desvio padrão da média variou de $0,033$ a $0,293$.

Pelas Figuras 13 e 14 constata-se que os soros dos bezerros búfalos apresentaram ausência de anticorpos IgG anti-Ex, anti-ES e anti-LPE de *T. vitulorum* logo após o nascimento, porém foram altamente reativos ao ELISA indireto com altos níveis desses anticorpos 24 horas após mamarem o colostro materno. Demonstrando a aquisição passiva dos anticorpos por via mamária. Estes anticorpos permaneceram em concentrações relativamente altas no soro, mas com leve declínio

de 1 a 45 dias, para em seguida apresentarem queda acentuada até aproximadamente 150 dias. A partir desta idade (150 dias) para os antígenos ES e Ex e aos 90 dias para o antígeno LPE, as concentrações dos anticorpos começaram a elevar-se levemente até o término do experimento (365 dias). Os anticorpos anti-LPE foram detectados em maiores concentrações, seguidos por anti-Ex e por anti-ES

figura 13.

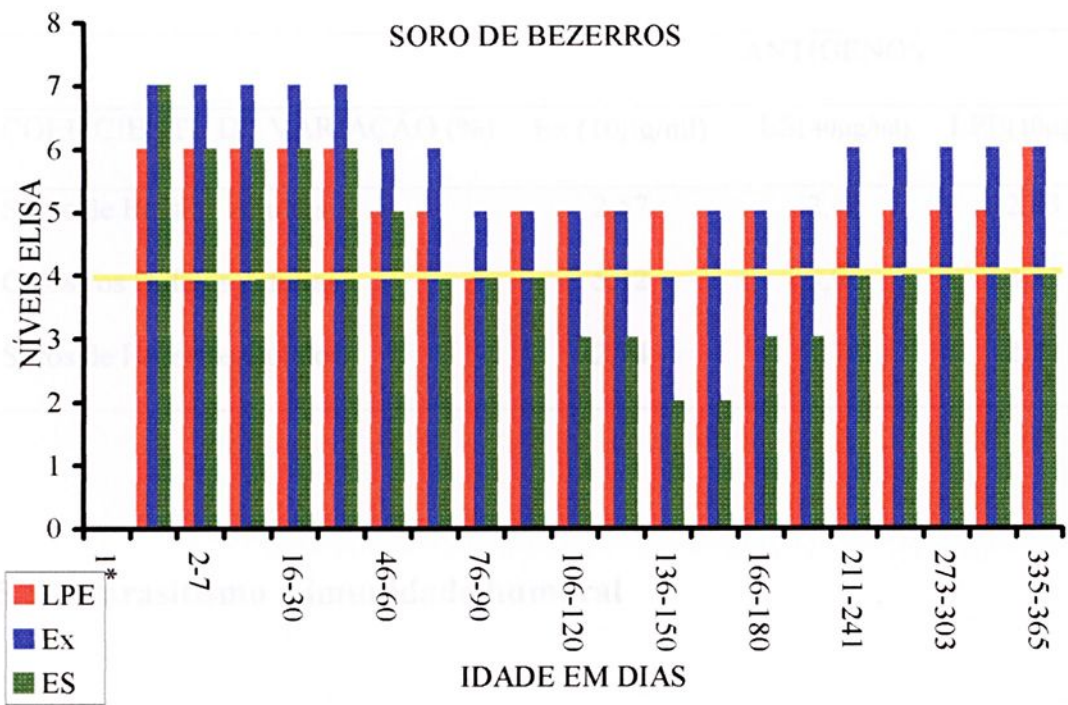


FIGURA 14. Níveis ELISA (NE) dos soros de bezerros búfalos de 1 a 365 após o nascimento (n = 7 a 10), utilizando-se antígenos ES (40 µg/ml), Ex (10 µg/ml) e LPE (10 µg/ml) de *Toxocara vitulorum*, no nível quatro está representado o ponto de corte. 1* = 1 dia de vida sem mamar o colostro

5.5 – Coeficiente de variação

Através da Tabela 17, constata-se que o antígeno ES (40µg/ml) foi o que apresentou dentre os três antígenos menor coeficiente de variação, seguido logo após o

antígeno LPE e Ex, ambos na concentração de 10µg/ml. Já o soro de bezerros búfalos foi o que apresentou menor valor de coeficiente de variação (ES = 1,78). Sendo que o colostro de búfalas adultas apresentou o maior valor de coeficiente de variação (LPE = 4,23).

TABELA 17. Coeficientes de variação do teste ELISA indireto

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)	ANTÍGENOS		
	Ex (10µg/ml)	ES(40µg/ml)	LPE(10µg/ml)
Soros de Búfalas Adultas	2,57	2,42	2,83
Colostros Búfalas Adultas	5,42	3,96	4,23
Soros de Bezerros Búfalos	2,74	1,78	2,32

5.6 – Parasitismo x imunidade humoral

Na Figura 15, observa-se que os bezerros búfalos apresentaram níveis máximos de anticorpos (representados pelos resultados A/P) com os três antígenos testados (Ex, ES e LPE) do primeiro dia de vida, após mamarem o colostro, a até atingirem de 31 a 45 dias de vida. Coincidentemente, estes níveis altos de IgG foram detectados entre o período de pré-patência ao pico do parasitismo por *T. vitulorum*. Quando os níveis ELISA começaram a declinar, ocorreu a expulsão destes parasitas pelas fezes dos animais, caracterizando o fenômeno da cura espontânea ou de “auto-cura”.

Novamente estes anticorpos começaram a ser detectados em níveis levemente aumentados no soro destes animais a partir de 211 dias pós-nascimento. Neste período,

os animais não se encontravam mais parasitados, pelo menos, não se evidenciou mais a presença de ovos em suas fezes.

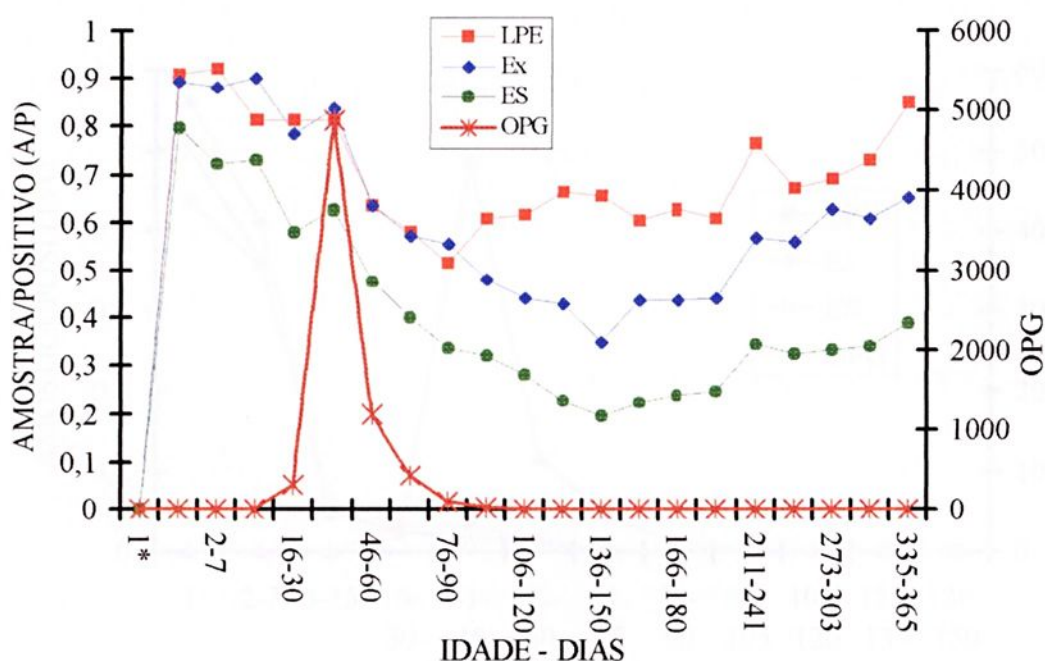


FIGURA 15. Valores A/P (Amostra/Positivo) sorológicos comparados com o OPG de bezerros búfalos durante o período de 1 a 365 dias de vida (n = 7 a 10). 1* = Bezerros búfalos sem mamar o colostro.

Os anticorpos detectados no soro destes animais nos primeiros dias de vida, foram adquiridos passivamente através do colostro. Estes anticorpos maternos permaneceram na corrente sanguínea dos bezerros búfalos pelo período aproximado de até 2 meses, quando então começaram a declinar mais acentuadamente. Os níveis mais altos de anticorpos detectados a partir de 90 dias (anti-LPE) e 150 dias (anti-Ex e ES) foram adquiridos ativamente.

Pela Figura 16, percebe-se a correlação do estado parasitário dos animais através do OPG, com os valores A/P dos anticorpos detectados no colostro das búfalas-mães.

No entanto, mesmo os animais continuando sujeitos a reinfecções, pelas exposições constantes dos ovos infectantes eliminados para o meio ambiente pelos

antígeno ES de *T. canis*. As búfalas apresentaram valores médios de absorbância de $2,374 \pm 0,484$; e os bezerros de $2,520 \pm 0,858$.

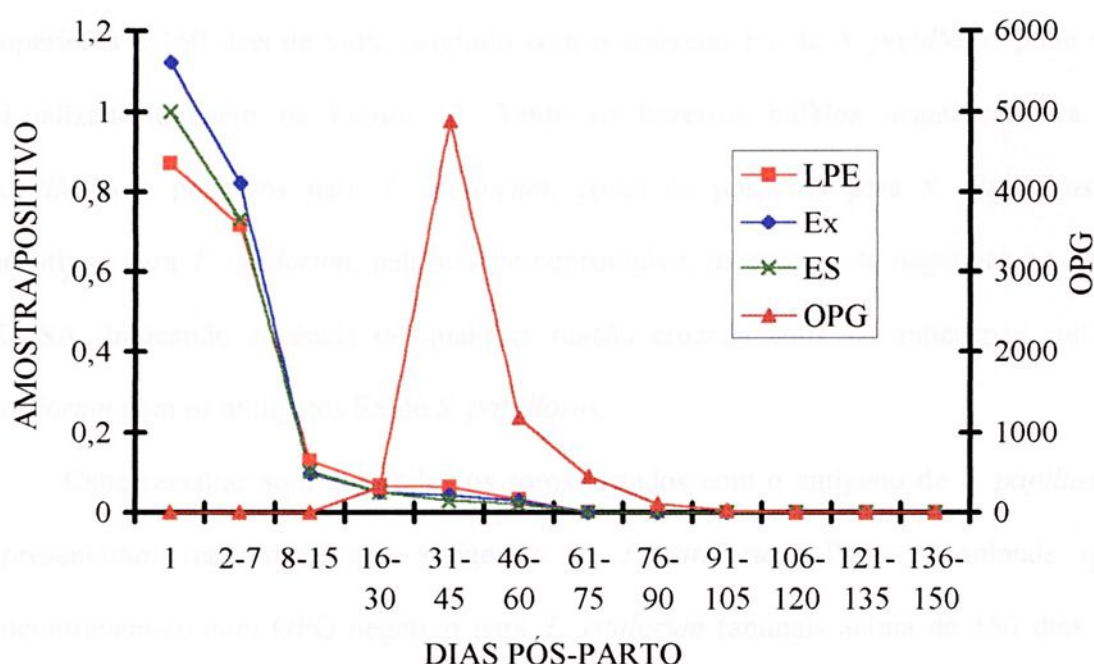


FIGURA 16. Valores A/P (Amostra/Positivo) dos colostros de búfalas comparados com OPG de bezerros búfalos no período de 1 a 150 dias pós-nascimento.

5.7 - Reação cruzada com ES de *T. canis*

O resultado da reação cruzada dos soros de bezerros búfalos recém-nascidos e búfalas recém-paridas com o antígeno ES de *T. canis* pode ser visualizado na Figura 17. É visível a reatividade cruzada positiva entre os soros imunes anti *T. vitulorum* (búfalas recém-paridas e bezerros nascidos que já haviam mamados o colostro) com o antígeno ES de *T. canis*. As búfalas apresentaram valores médios de absorbância de $2,374 \pm 0,858$.

5.8 - Reação cruzada com Ex de *S. papillosus*

O resultado da reação cruzada dos soros de bezerros búfalos com idades superiores a 150 dias de vida, reagindo com o antígeno Ex de *S. papillosus* pode ser visualizado também na Figura 17. Tanto os bezerros búfalos negativos para *S. papillosus* e positivos para *T. vitulorum*, como os positivos para *S. papillosus* e negativos para *T. vitulorum*, pelo exame coprológico, mostraram-se negativos ao teste ELISA. Indicando ausência de qualquer reação cruzada entre os anticorpos anti-*T. vitulorum* com os antígenos Ex de *S. papillosus*.

Cabe ressaltar aqui que todos os soros testados com o antígeno de *S. papillosus* apresentaram reatividade aos antígenos de *T. vitulorum*. Para os animais que encontravam-se com OPG negativo para *T. vitulorum* (animais acima de 150 dias de idade) estavam sujeitos à contaminação ambiental por ovos de *T. vitulorum*, pois não foram isolados do foco parasitário (larvas infectantes no colostro e ovos infectantes do meio ambiente).



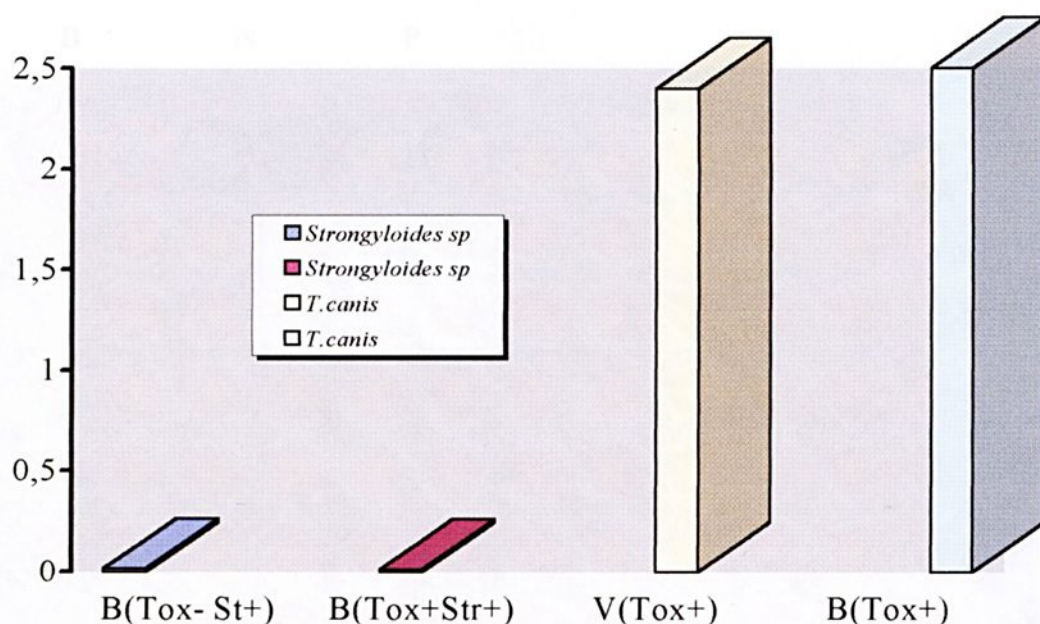


FIGURA 17. Reatividade do antígeno Ex de *Strongyloides papillosus* e ES de *Toxocara canis* com soros de búfalas adultas e de bezerros búfalos com idade acima de 150 dias. Sendo que B (Tox-Str+) = bezerros com OPG negativo para *Toxocara vitulorum* e positivo para *S. papillosus* (n = 3); B (Tox+Str+) = bezerros com OPG positivo para *T. vitulorum* e positivo para *S. papillosus* (n = 3); V (Tox+) = búfalas adultas com OPG positivo para *T. vitulorum* (n=6); B (tox+) = bezerros búfalos com OPG positivos para *T. vitulorum* B(tox+).

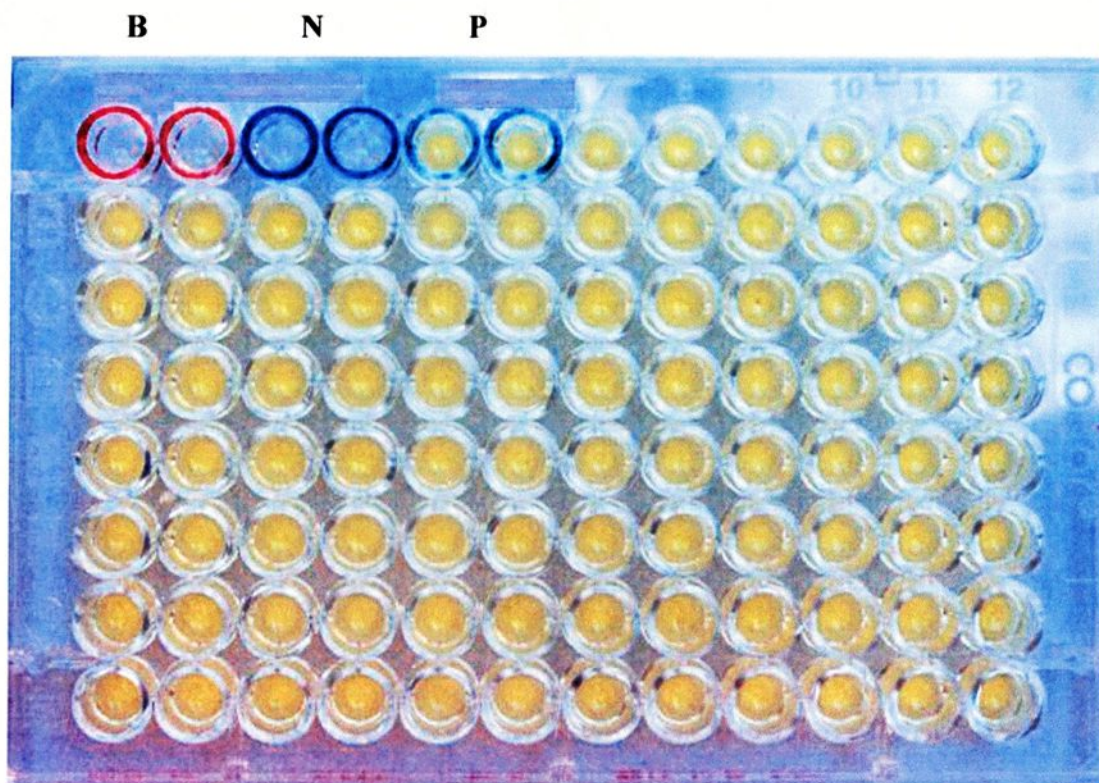


FIGURA 18. Placa ELISA, reação dos soros de búfalas adultas, reagindo com antígeno Ex (10 µg/ml) de *T. vitulorum*. B = branco da reação; N = soro de referência negativa; P = soro de referência positiva.

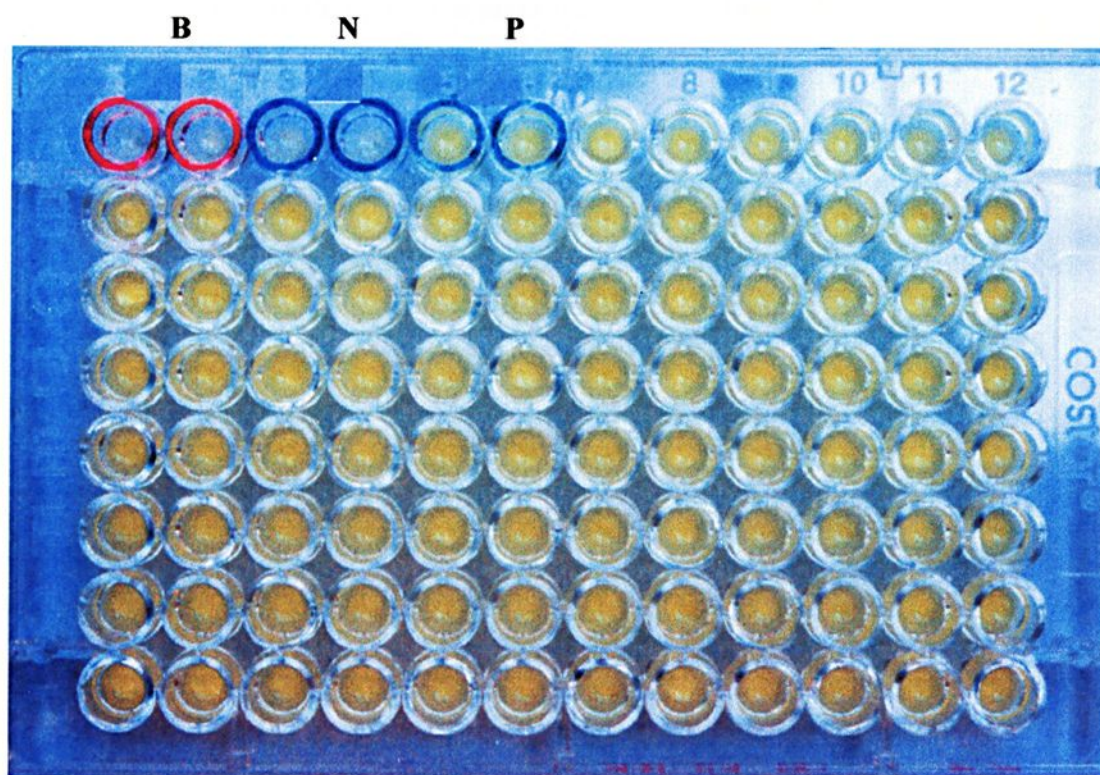


FIGURA 19. Placa ELISA reação dos soros de bezerros búfalos, reagindo com antígeno ES (40 µg/ml) de *T. vitulorum*. B = branco da reação; N = soro de referência negativa; P = soro de referência positiva

B N P

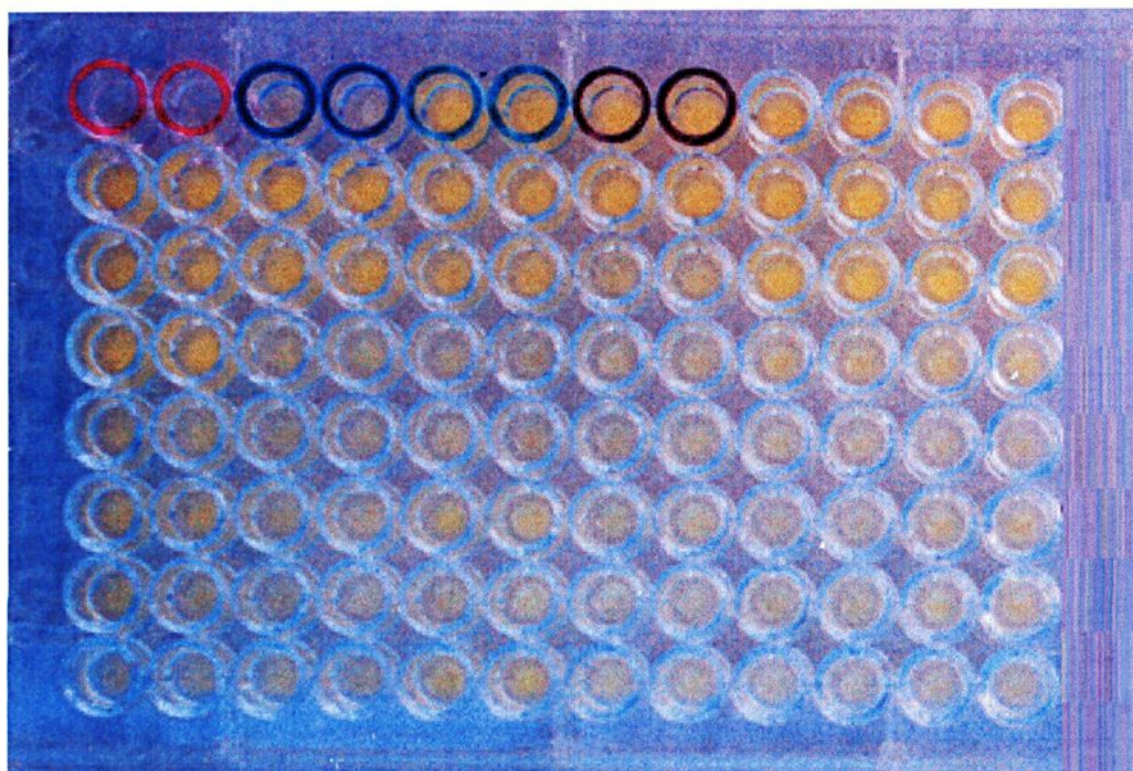


FIGURA 20. Placa ELISA, reação dos colostros de búfalas adultas, reagindo com antígeno Ex (10 µg/ml) de *T. vitulorum*. B = branco da reação; N = colostro de referência negativa; P = colostro de referência positiva

6 - DISCUSSÃO

Dentre as parasitoses de maior importância aos ruminantes, os parasitas gastrointestinais, onde inclui-se os nematódeos, são considerados fontes de maior entrave na produção desses animais. No caso de *T. vitulorum*, sua prevalência intestinal em bezerros búfalos leva a sérias perdas econômicas em várias partes do mundo, onde é comum a criação dessa raça (Omar e Barriga, 1991; Roberts, 1993).

Através do estudo visando detectar a presença de anticorpos em búfalos infectados naturalmente por *T. vitulorum*; acompanhando assim, parte do comportamento desses animais na aquisição de imunidade frente a esse parasitismo, ou seja, a imunidade humoral. Realizou-se o monitoramento do parasitismo pelo exame de coprológico e em seguida testou-se os soros e colostros dos animais pelo método ELISA indireto.

Conforme os resultados do exame coprológico (OPG), constatou-se uma precocidade na aquisição desta parasitose pelos bezerros búfalos examinados. O período pré-patente apresentado por estes animais variou de 23 a 36 dias e o pico máximo de eliminação de ovos ocorreu com a idade média de $44,3 \pm 6,6$ dias. O declínio do número de ovos nas fezes ocorreu entre 106 a 120 dias de vida, determinando o período de patência médio de 58,55 dias. Estes resultados apresentaram-se semelhantemente aos de Roberts (1990b), o qual observou um

período de pré-patência média de 22,3 dias; o pico do parasitismo em torno de 35,7 dias de vida e o período de patência de 35 dias.

A precocidade desta infecção pode ser atribuída pela aquisição de larvas infectantes deste parasita pelo colostro. Isto foi comprovado por Warren (1969 e 1971), Tongson (1971), Chauhan et al. (1974), Mia et al. (1975), Gautam et al. (1976), Baruah et al. (1981), Banerjee et al. (1983), Starke et al. (1983), Roberts et al. (1990ab) e Rajapakse et al. (1994) os quais constataram que quando os animais ingeriam o colostro, recebiam de suas mães, uma carga parasitária significativa de larvas no estágio 4 (L₄) de *T. vitulorum*. Assim, os animais recém-nascidos, entravam em contato direto com essas larvas provindas da glândula mamária, favorecendo a sobrevivência do parasita em questão. Facilitando assim, seu ciclo de vida bem como a perpetuação de sua espécie. Starke et al. (1992) observaram a presença dessas larvas no colostro de búfalas recém-paridas até o vigésimo sexto dia pós-parto, com maior concentração destas nos primeiros 10 dias pós-parto. A infecção por *T. vitulorum* ocorreu em mais de 50% das búfalas analisadas e 100% dos bezerros búfalos tornaram-se infectados até os 30 primeiros dias de vida.

Na presente pesquisa, a partir de 45 dias de idade, evidenciou-se um rápido declínio na contagem do OPG, coincidindo com a expulsão espontânea de *T. vitulorum* adultos através das fezes dos bezerros búfalos. A partir dos 120 dias, o OPG tornou-se negativo, caracterizando assim, o processo da “auto-cura” pelo hospedeiro. Processo este, já constatado em infecções por *T. vitulorum* em búfalos por Chauhan et al. (1974), Gupta (1976), Costa et al. (1980), Starke et al. (1983) e Roberts (1990ab).

As causas que contribuem para o processo de “auto-cura” ainda encontram-se em estudo. Porém, Castro (1989 e 1992) descreveu uma interrelação entre as células

do sistema imunológico e o tecido local na resposta às reações imunofisiológicas, que contribui para a expulsão do parasita pelo respectivo hospedeiro. Além disso, Castro (1989) sugeriu que a resposta imune celular local era mais eficaz do que a humoral, na expulsão de *T. spirallis*. Mas, por outro lado, Jones et al. (1990) concluíram que a presença de anticorpos parasita-específico estava muito relacionado com o processo de rejeição do *T. colubriformis* em ovinos.

No entanto, apesar da parasitose por *T. vitulorum* possuir uma ampla distribuição, sendo esta encontrada em várias partes do mundo, principalmente em lugares onde a criação de animais da espécie bubalina é frequente, pode-se afirmar a necessidade de estudos mais aprofundados com relação aos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro contra essa parasitose.

Para estudar a resposta imune humoral de bubalinos, o método ELISA indireto foi empregado na presente pesquisa. Este método, proposto inicialmente para diagnosticar babesiose bovina, por Machado et al (1997), foi adaptado e padronizado com a finalidade de ser utilizado para a detecção de anticorpos anti- *T. vitulorum*. Desta forma, após a padronização deste método, através de titulações em blocos de soros/colostros de referência positiva e negativa com antígenos em diferentes concentrações, os melhores resultados de reatividade foram obtidos empregando-se o antígeno Ex e LPE a 10 µg/ml e o ES a 40 µg/ml na diluição sorológica/colostral de 1/100. Já o conjugado anti-IgG de coelho foi determinado ser 1/1000 a diluição adequada.

Após a padronização do método ELISA indireto, os resultados obtidos indicaram que os bubalinos infectados naturalmente com *T. vitulorum*, apresentaram anticorpos anti-Ex, ES e LPE deste parasita, nos soros dos bezerros búfalos e nos soros e colostros das búfalas durante o período analisado. Estes resultados indicaram

que o método ELISA empregado mostrou-se adequado para avaliar a resposta imune humoral dos bubalinos.

Assim, analisando-se os soros das búfalas, através deste método, constatou-se altos valores no nível de anticorpos anti-Ex, ES e LPE, não somente no período de peri-parto, como também durante todo o ciclo reprodutivo. Ou seja, de parto a parto. Da mesma maneira, Rajapakse et al. (1994), em amostras sorológicas de búfalas no periparto detectaram também anticorpos anti-ES de *T. vitulorum*. Além disso, notou-se que os antígenos ES e Ex (provenientes de larvas infectantes), foram os que apresentaram em média, reatividades levemente superiores que a do LPE. Esse fato pode ser explicado pela existência de larvas migratórias e hipobióticas nos tecidos dos animais mais resistentes, como as búfalas adultas. Evidência esta sugerida por Omar e Barriga (1991), de que a presença das larvas migratórias e/ou em hipobiose no organismo do hospedeiro adulto materno, poderia provocar um estímulo contínuo em seu sistema imunológico. Situações consideradas estressantes para a parturiente, como as que ocorrem devido à prenhez e à amamentação fazem com que o sistema imunológico do animal encontre-se deprimido (Lloyd, 1983). Esta depressão imunológica provavelmente originada pela liberação de hormônios da prenhez e/ou lactação ou do ciclo estral do animal poderia contribuir para a mobilização das larvas que se encontravam em hipobiose na musculatura (Roberts, 1993).

Na presente pesquisa, os anticorpos IgG detectados nos colostros das búfalas recém-paridas também reagiram fortemente com os três antígenos pesquisados (Ex, ES e LPE). Os níveis de anticorpos do colostro desses animais apresentaram os mais altos valores A/P e níveis ELISA no dia do parto. A partir do sétimo dia, ocorreu um rápido declínio na concentração destes anticorpos, atingindo níveis ELISA zero (antígenos ES e Ex), que permaneceram assim até aos 60 dias pós-parto, ou seja, com

ausência dos mesmos no leite. Já os anticorpos anti-LPE do colostro, permaneceram positivos, embora em concentração baixa, por mais 15 dias, antes de atingirem níveis ELISA zero. Estes resultados são concordantes com os de Rajapakse et al. (1994) que detectaram altos níveis de anticorpos anti-*T. vitulorum* no colostro de búfalas recém-paridas até o décimo dia pós-parto, quando em seguida apresentou queda acentuada desses níveis.

A presença de larvas de *T. vitulorum* na glândula mamária, estimula o aumento na síntese de anticorpos locais. Newby e Borne (1977) indicaram em seus estudos realizados com colostros de vacas (espécie bovina), como sendo de origens sérica (sistêmica) ou local (glândula mamária) a imunoglobulina de classe IgM, assim como IgA, porém IgA com produção maior a nível sistêmico. Já a imunoglobulina IgG1 secretada no colostro seria toda produzida do soro e IgG2 seria somente produzida na própria glândula; concluíram assim, que a capacidade de síntese de todas as imunoglobulinas seria uma resposta à estimulação imune local. Rajapakse et al. (1994) consideraram que a classe de imunoglobulina IgG, especialmente a IgG1, como sendo dentre as imunoglobulinas secretadas no colostro, a que possui a principal ação contra as infecções por *T. vitulorum* em búfalos. Porém, no estudo aqui apresentado, as subclasses de imunoglobulinas não foram pesquisadas.

O presente trabalho, demonstrou que os soros de bezerros búfalos recém-nascidos e que não tiveram acesso ao colostro encontravam-se desprovidos de anticorpos a nível sorológico, ou seja, não possuíam anticorpos contra nenhum dos antígenos testados (ES, Ex e LPE). Porém, em análises sorológicas desses bezerros dentro das primeiras 24 horas pós nascimento e com acesso ao colostro, foi demonstrado a presença desses anticorpos em concentrações máximas. Isto confirmou, que a aquisição de imunoglobulinas em ruminantes não é via placentária

mas sim colostrar, concordando com Tizard (1996), o qual informa que o tipo de placenta de ruminantes (sindesmocorial) não permite a passagem de nenhum tipo de anticorpo para o feto. Rajapakse et al. (1994) e Starke et al. (1999 e 2001) também obtiveram resultados semelhantes, comprovando a recepção de anticorpos IgG pelos bezerros búfalos através do colostro materno. Desta maneira, resultados encontrados por Rajapakse et al. (1994), utilizando-se das técnicas de imunodifusão em gel e ELISA indireto e o antígeno ES larval de *T. vitulorum*, não detectaram qualquer reação positiva em amostras de soro de bezerros búfalos recém-nascidos sem mamar o colostro. No entanto, no segundo dia, ou seja, após a mamada do colostro pelos bezerros, estes autores detectaram índices de 75% e de 100% de positividade nos soros desses animais, pelos testes de imunodifusão e ELISA, respectivamente: indicando aquisição passiva desses anticorpos pelo colostro materno. Por outro lado, Jalnapurkar et al. (1976) detectaram a presença de imunoglobulina IgG no soro de alguns, mas não de todos os bezerros recém-nascidos sem ingerirem colostro e, concluíram que esse fato implicaria em uma imunocompetência por parte do organismo do bezerro, enquanto ainda na fase fetal. Apesar dos bezerros búfalos ingerirem grande quantidade de imunoglobulinas IgG anti-*T. vitulorum* na primeira semana de vida, eles também ingerem larvas infectantes através do colostro. Mesmo recebendo estas imunoglobulinas, os animais não são protegidos satisfatoriamente e tornam-se infectados. Este fato também verificado por Starke et al. (1999 e 2001) utilizando o antígeno Ex larval de *T. vitulorum* para detectar anticorpos sorológicos de búfalos recém nascidos até 180 dias de idade, como também de búfalas em seu peri-parto. Estes autores porém, concluíram ao encontrarem ovos deste parasita nas fezes de bezerros aos 15 dias de idade, que os anticorpos provindos passivamente



pelo colostro não forneceram proteção imunológica suficiente contra o parasita em questão.

Em torno da época do pico do parasitismo (35 a 57 dias), os níveis de anticorpos séricos dos bezerros, ainda altos (anticorpos provenientes do colostro), começaram a declinar até os 90 dias de idade. Este declínio na concentração de anticorpos coincidiu também com a rejeição do parasita pelos hospedeiros. Seguindo esta queda na concentração de anticorpos, houve uma elevação, possivelmente anticorpos adquiridos ativamente. Os anticorpos anti-LPE foram mais precoces, elevando-se no soro dos animais já a partir dos 90 dias, enquanto anticorpos anti-Ex e ES foram mais tardios, elevando-se a partir dos 150 dias de idade. Interessante notar que o antígeno que melhor reagiu com o soro dos bezerros búfalos, foi o LPE, seguido do Ex e por último do ES. Além disso, o antígeno LPE manteve-se em níveis ELISA, praticamente constantes mas com pequenas flutuações por todo o período analisado. Amerasingue et al. (1992) imunizando camundongos com os antígenos ES e Ex de larvas e adultos, bem como o LPE de adulto de *T. vitulorum* promoveram proteção contra essa parasitose, onde o antígeno LPE e ES larval proporcionaram a melhor resposta imunológica. Rajapakse et al. (1994) concluíram pelos resultados de OPG, inversamente proporcional aos títulos altos de anticorpos, que esses anticorpos promoviam proteção contra a infecção por *T. vitulorum* em bezerros búfalos. Pela presente pesquisa, em função desta coincidência temporal entre os níveis altos de anticorpos sorológicos dos bezerros búfalos com o pico do parasitismo, seguido do declínio simultâneo do OPG e dos anticorpos, pode-se inferir, que a imunidade humoral teve participação neste processo de auto-cura. No entanto, cabe ressaltar aqui que este processo de rejeição ou auto cura, já mencionados anteriormente, é um processo complexo, o que sugere o envolvimento não somente da imunidade

humoral como também da celular, assim como outros mecanismos de imunidade inespecífica.

A produção desses anticorpos confirma que o sistema imunológico dos bezerros búfalos vai se desenvolvendo com a idade, produzindo ativamente anticorpos específicos através da estimulação antigênica, pela presença do parasita no trato intestinal. Assim, o parasita ao se desenvolver até a sua forma adulta, elimina antígenos, não só pela sua presença no organismo parasitado, como também pela sua atividade metabólica, promovendo eliminação de excretas fisiológicos naturais de seu organismo.

Além disso, devido à presença desses parasitas adultos pelos animais parasitados, pode ocorrer uma infestação contínua na pastagem, através da eliminação de ovos pelas fezes, bem como uma reinfecção dos hospedeiros (Warren, 1971 e Roberts, 1993). No entanto, esta reinfecção não foi observada nos bezerros búfalos, pois os ovos deste parasita não foram encontrados nas fezes durante o período pós-expulsão (120 a 365 dias). Concordantemente, Starke et al. (1983) realizando exames coprológicos de bubalinos pelo período de um ano após o nascimento, observaram que após a expulsão destes nematódeos pelas fezes, ovos destes parasitas não mais foram detectados. No entanto, isto não inviabiliza a possibilidade da presença de larvas retidas em granulomas pelos tecidos dos hospedeiros através da migração tecidual. Como os búfalos, são animais extremamente precoces para reprodução, pois Okuda et al. (1999) constataram idade média da primeira parição já aos 28 meses. As novilhas infectadas com larvas teciduais, podem constituir fontes de infecção para as gerações subsequentes.

Com relação à reação cruzada, Roberts (1993) comenta que anticorpos anti-*T. vitulorum* contra antígenos de vários ascarídeos podem reagir de forma cruzada



entre si. Assim, no trabalho realizado, foi evidenciada uma reatividade cruzada positiva com o antígeno ES de *T. canis* com os anticorpos anti-ES, Ex e LPE de *T. vitulorum*. Por outro lado, o antígeno Ex de *S. papillosus* reagiu negativamente com soros de búfalas e de bezerros búfalos. Estes soros testados com este antígeno foram, no entanto, altamente reativos com os antígenos obtidos de *T. vitulorum*, indicando assim a inexistência de reação cruzada. Da mesma forma, Rajapakse (1993) citado por Rajapakse (1994) não observou precipitados na superfície corporal e na região oral de larvas de *Strongyloides* spp incubadas com o colostro de búfalas, naturalmente infectadas com *T. vitulorum*; indicando inexistência da reação cruzada, pelo método da imunofluorescência indireta.

Os resultados aqui apresentados pela presente pesquisa, indicam que os três antígenos preparados a partir das larvas e do adulto de *T. vitulorum* reagiram fortemente com anticorpos presentes no soro e no colostro dos bubalinos, indicando antigenicidade. Desta forma, estes resultados encorajam a continuidade da presente pesquisa, no sentido de se conhecer ou de se determinar também o papel imunogênico das moléculas antigênicas destes antígenos e de usá-las como valor de diagnóstico ou uma possível vacina.



7 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pôde-se concluir que:

- Através da contagem e identificação de ovos pela técnica de OPG, todos os bezerros encontraram-se naturalmente infectados por *T. vitulorum*;
- Os antígenos Ex, ES larvais e LPE de adultos de *T. vitulorum* demonstraram antigenicidade com ótima reatividade para os anticorpos séricos e colostrais dos búfalos;
- O método ELISA indireto, demonstrou sensibilidade na detecção de anticorpos anti-*T. vitulorum*, mas não especificidade;
- Ocorreu reação cruzada positiva e negativa dos antígenos ES de *T. canis* e Ex de *S. papillosus*, respectivamente, com os anticorpos sorológicos anti-*T. vitulorum* dos búfalos, através do método ELISA indireto;
- O método ELISA indireto empregado para este teste, pode ser considerado como teste com valor diagnóstico para a toxocarose;

- A imunização passiva adquirida pelos bezerros, através da obtenção dos anticorpos via colostro, não foi suficiente para proteger os bezerros contra a parasitose por *T. vitulorum*, pois evidenciou-se o parasitismo precoce destes animais;
- Os anticorpos recebidos passivamente ou produzidos ativamente contribuíram para o processo de expulsão dos parasitas pelos hospedeiros. Esta resposta humoral pode estar associada a outros mecanismos imunológicos de defesa do animal neste processo.



8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-SHEHADA, M. N., HERBERT, I. V. Anthelmintic effect of levamisole, ivermectin, albendazole and fenbendazole on larval *Toxocara canis* infection in mice. **Research in Veterinary Science**, v.36, p.87-91, 1984.
- ABO-SHEHADA, M. N. et al. Acquired immunity to *Toxocara canis* infection in mice **Veterinary Parasitology**, v.38, p.289-98, 1991.
- ALJEBOORI, T. I., IVEY, M. H. An improved hemagglutination technique for detecting antibody against *Toxocara canis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.19, p.244-8, 1970.
- AMERASINGHE, P. H. et al. Antigen-induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. **Parasitology Research**, v.78, p.643-7, 1992.
- ARAUJO, P. Observações pertinentes às primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* e *Toxocara canis*. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v.14, p.83-90. 1972.
- BADLEY, J. E. et al. Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: the role of excretory-secretory antigens. **Parasite Immunology**, v.9, p.133-43, 1987.



- BANERJEE, D. P. et al. Public health significance of *Neoscaris vitulorum* larvae in buffalo milk samples. **The Journal of Parasitology**, v.69, p.1124, 1983.
- BARRIGA, O. O., MYSER, W. C. Effects of irradiation on the biology of the infective larvae of *Toxocara canis* in the mouse. **The Journal of Parasitology**, v.73, p.89-94, 1987.
- BARRIGA, O. O. Rotational control of canine toxocariasis by the veterinary practitioner, **JAVMA**, v.198, p.216-21, 1991.
- BARRIGA, O. O., OMAR, H. M. Immunity to *Toxocara vitulorum* repeated infections in a rabbit model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.33 p.249-60, 1992.
- BARUAH, P. K. et al. Relationship between presence of 3th stage larvae of *Neoscaris vitulorum* and *Strongyloides papillosus* in colostrum/milk of buffalo and appearance of eggs in the faecal samples of their calves. **Indian Journal of Dairy Science**, v.34, p.76-8, 1981.
- BEAVER, P. C. et al. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases. **Pediatrics**, v.9 p.7, 1952.
- BOWMAN, D. D. et al. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.36, p.75-82, 1987.
- BRUNASKA, M. et al. *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. **International Journal for Parasitology**, v.25, p.683-90, 1995.
- CASTRO, G. A. Immunophysiology of enteric parasitism. **Parasitology Today**, v.5, p.11-9, 1989.



- CASTRO, G. A. Intestinal physiology in the parasitized host: integration, desintegration, and reconstruction of systems. **Annals New York Academy of Sciences**, v.664, p.369-79, 1992.
- CASTRO, G. A., ARNTZEN, C. J. Immunophysiology of the gut: a research frontier for integrative studies of the common mucosal immune system. **American Journal Physiology**, v.265, p.G-599-610, 1993.
- CHAUHAN, P. P. S., PANDE, B. P. Migratory behaviour and histopathology of *Neoscaris vitulorum* larvae in albino mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.10, p.193-200, 1972.
- CHAUHAN, P. P. S. et al. A note on migratory behaviour of *Neoscaris vitulorum* larvae in albino rat and chicken: a histology study. **Indian Journal Animal Science**, v.44, p.801-4, 1974.
- CLAEREBOUT, E., VERCUYSSSE, J., The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. **Parasitology**, v.120, p.25-42, 2000.
- CONCEPTION, J. E., BARRIGA, O. O. Transfer of infection-induced immune protection to *Toxocara canis* in a mouse model. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.9, p.371-82, 1985.
- COSTA, A. J. et al. Desenvolvimento das helmintoses gastrointestinais em búfalos (*Bubalus bubalis*) nascidos em Sertãozinho (SP). **Boletim da Indústria Animal**, v.37, p.195-205, 1980.
- CUELLAR, C. et al. Evaluation of chemotherapy in experimental toxocariasis by determination of specific immune complexes. **Journal of Helminthology**, v.64, p.279-89, 1990.

- CYPESS, R. H. et al. Larva specific antibodies in patients with visceral larva migrans. **Journal of Infections Diseases**, v.135, p.633-40, 1977.
- DAS, K. M. et al. Calf ascariasis in India. A nine years survey with special reference to "Hetrazan". **The British Veterinary Journal**, v.111, p.342-7, 1955.
- DE SAVIGNY, D. H., TIZARD, I. R. Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, p.501-7, 1977.
- DE SAVIGNY, D. H. et al. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Patology**, v.32, p.248-88, 1979.
- ENGVAL, E., PERLMANN, P., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantification of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. **Journal of Immunology**, v. 109, p. 129-35, 1972.
- ENYENIHI, U. K. Pathogenicity of *Neoascaris vitulorum* infections on calves. **Bulletin Epizootic Disc African**, v.17. p.171-9. 1969.
- ENYENIHI, U. K. Migration of *Neoascaris vitulorum* larvae in guinea pigs and calves. **Nigerian Journal of Science**, v.4, p.59-65, 1970.
- FAGERHOLM, H. P. et al. Diferentiation of cuticular structures during the growth of the third-stage larva of *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaridoidea) after emerging from the egg. **The Journal of Parasitology**, v.86, p.421-7, 2000.
- GAUTAM, O. P. et al. *Neoascaris vitulorum* larvae in the colostrum/milk of buffaloes. **Current Science**, v.45, p.350, 1976.



- GUPTA, G. C. et al. Some aspects of biochemical studies in calf diseases ascaridiasis and scour. **Indian Veterinary Journal**, v.53, p.436-41, 1976.
- HERLICH, H. On the migratory behavior of the larvae of *Neoascaris vitulorum* (Goeze, 1782), Travassos 1927 in white mice. **Proceedings Helminthological Society of Washington**, v.20, p.124-6, 1953.
- HERLICH, H., PORTER, D. A. Prenatal infection of a calf with the Nematode, *Neoascaris vitulorum* **Journal Parasitology**, v.39, p.33-4, 1953.
- JALNAPURKAR, B. V. et al. Immunoglobulin G in the sera of newborn buffalo (*Bos bubalus bubalis*) calves. **The Veterinary Record**, v.99, p.146, 1976.
- JONES, W. O. et al. Histamine and leukotriene concentrations in duodenal tissue and mucus of lambs selected for high and low responsiveness to vaccination and challenge with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v.20, p.1075-9, 1990.
- JONES, R. E. et al. *Toxocara canis*: Failure to find IgE receptores (FcεR) on eosinophils from infected mice suggests that murine eosinophils do not kill helminth larvae by an IgE-dependent mechanism. **Experimental Parasitology**, v.78, p.64-75, 1994.
- JUNG, R. C., PACHECO, G. Use of a hemagglutination test in visceral larva migrans. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.9, p.185-91, 1960.

- KAYES, S. G., OAKS, J. A. Development of the granulomatous response in murine toxocariasis. **The American Journal of Pathology**, v.93, p.277-94, 1978.
- LLOYD, S. Effect of pregnancy and lactation upon infection. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.4, p.153-76, 1983.
- LOMBARDI, S. et al. The *in vitro* adherence of murine eosinophils, Neutrophils and non-induced and induced macrophages to infective larvae of *Toxocara canis* (Nematoda, Ascarididae). **International Journal Parasitology**, v.20, p.603-13, 1990.
- MACHADO, R. Z. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.71, p.17-26, 1997.
- MACKENZIE, C. D. et al. Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. **Nature**, v.276, p.826-8, 1978.
- MACKENZIE, C. D. et al. Ativation of complement, the induction of antibodies to the surface of nematodes and the effect of these factors and cells on worm survival *in vitro*. **Europe Journal Immunology**, v.10, p.594-601, 1980.
- MACKENZIE, C. D. et al. The *in vitro* interactions of eosinophils, neutrophils, macrophages and mast cells with nematode surfaces in the presence of complement or antibodies. **Journal Pathology**, v.133, p.161-75, 1981.
- MAIZELS, R. M. et al. Proteases inhibitors. In:____. **Parasite antigens, parasite genes: a laboratory manual for molecular parasitology**, Cambridge: Cambridge University Press, 1991, p.103-4.

- MATSUMURA, K. et al. Detection of circulating toxocaral antigens in dogs by sandwich enzyme-immunoassay. **Immunology**, v.51, p.609-13, 1984.
- MEEUSEN, N. T. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.259-73, 1999.
- MIA, S. et al. The route of infection of buffalo calves by *Toxocara (Neoascaris) vitulorum*. **Tropical Animal Health Production**, v.7, p.153-6, 1975.
- MILLER, T. A. Vaccination against the canina hookworm disease. **Advances in Parasitology**, v.9, p.153-83, 1971.
- NEWBY, T. J., BOURNE, J., The nature of the local immune system of the bovine mammary gland. **The Journal of Immunology**, v.118, p.461-5, 1977.
- NOBLE, E. R. et al. Parasitology: the biology of animal parasites. Ed. Lea e Febiger (USA), 1989, p. 574..
- NUNES, C. M. et al. Toxocariasis: Serological diagnosis by indirect antibody competition ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 2, 1999.
- OKUDA, H. T. et al. Idade a puberdade, idade a primeira cria e intervalo entre partos de búfalos. **Veterinária Notícias**, v.5, p.91-6, 1999.
- OLSON, L. J. Organ distribution of *Toxocara canis* larvae in normal mice and in mice previously infected with *Toxocara*, *Ascaris* or *Trichinella*. **Tex Rep Biology Medicine** v.20, p.651, 1961.
- OMAR, H. M., BARRIGA, O. O., Biology and pathophysiology of *Toxocara vitulorum* infections in a rabbit model. **Veterinary Parasitology**, v.40, p.257-66, 1991.

- OSHIMA, T. Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migrations routes of the larvae. **Journal Parasitology**, v.47, 652, 1961.
- PAGE, A. P. et al. Comparison of isolates and species of *Toxocara vitulorum* and *Toxascaris* by biosynthetic labelling of somatic and ES proteins from infective larvae. **Parasitology**, v.103, p.451-64, 1991.
- PATNAIK, M. M., PANDE B. P. Notes on the helminthic infestations encountered in one month old buffalo calves. **The Indian Veterinary Journal**, v.40, p.128-33, 1963.
- PHILIPP, M. et al. Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. **Nature**, v.287, p.538-40. 1980.
- RAJAPAKSE, R. P. V. J. et al. *Toxocara vitulorum*: maternal transfer of antibodies from buffalo cows (*Bubalus bubalis*) to calves and levels of infection with *T. vitulorum* in the calves. **Research in Veterinary Science**, v.57, p.81-7. 1994.
- REFUERZO, P. G. et al. Studies on *Neoascaris vitulorum* (Goeze, 1782), I. Observations on the morphology of the ova and of their development to the infective stage, with notes on feeding experiments. **The Philippine Journal of Animal Industry**, v.13, p.15-22, 1952.
- REFUERZO, P. G., ALBIS-JIMENEZ, F. S. Studies on *Neoascaris vitulorum*. III. Further observations on inoculation of calves with notes on prenatal infection. **American Journal Veterinary Research**, v.15, p.532-4, 1954.

- ROBERTS, J. A. The life cycle of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal for Parasitology**, v.20, p.833-40, 1990a.
- ROBERTS, J. A. The egg production of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v.37, p.113-20, 1990b.
- ROBERTS, J. A. *Toxocara vitulorum* in ruminants. **Helminthological Abstract**, v.62, p.151-74, 1993.
- SMITH, H. V. A rapid method for hatching infective eggs of *Toxocara canis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p.215, 1989.
- SOARES, C. O. Princípio e padronização de provas sorológicas: Técnicas Imunoenzimáticas. In: MADRUGA, C. R. **II Curso de Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**, Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1999, p. 99-125.
- SRIVASTAVA, S. C. *Neoascaris vitulorum* (Goeze, 1782) Travassos, 1907, in intestinal perforation with its localisations in liver of buffalo calves. **The Indian Veterinary Journal**, v.40, p.758-62, 1963.
- STARKE, W.A. et al. Curso natural das helmintoses gastrintestinais em búfalos no Município de Andradina - SP. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.35, p.651-64, 1983.
- STARKE, W. A. et al. Transmissão transmamária de larvas de nematóides gastrintestinais a bezerros búfalos. II. Larvas de *Toxocara vitulorum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, p.97-103, 1992.



- STARKE, W. A., et al. Parasitism and immunological responses of water buffaloes to *Toxocara vitulorum*. In: JOINT MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PARASITOLOGISTS (74th annual meeting) AND SOCIETY OF NEMATOLOGISTS (38th annual meeting), 1999, Califórnia. **Program Guide and Abstracts for the...** Califórnia, 1999, p.148.
- STARKE-BUZETTI, W. A. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Toxocara vitulorum* in water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 55-64, 2001.
- STOLL, N. R. The occurrence of self-cure and protection in typical nematode parasitism. **Journal Parasitology**, v.15, p.147-8, 1929.
- SUGANE, K., OSHIMA, T. Trapping of large numbers of larvae in the livers of *Toxocara canis*-reinfected mice. **Journal of Helminthology**, v.57, p.95-9, 1983.
- SUGANE, K. et al. Eosinophilia, IL-5 level and recovery of larvae in IL-5 transgenic mice infected with *Toxocara canis*. **Journal of Helminthology**, v.70, p.153-8, 1996.
- TAFFS, L. F. Immunological studies on experimental infection of pigs with *Ascaris suum* (Goeze, 1782). III. The antibody response and acquired immunity. **Journal of Helminthology**, v.38, p.129-50, 1964.
- TAWFIK, M. A. A. Pathological changes induced by the migration of *Neoascaris vitulorum* in white rats. **Egypty Journal Veterinary Science**, v.12, p.85-8, 1975.



- TIZARD, R. I. Immunity to parasites. In: _____. **Veterinary Immunology An Introduction**. 5 ed. Pennsylvania: W. B. Saunders Company, 1996, p.315-29.
- TONGSON, M. S. *Neoascaris vitulorum* larvae in milk of Murrah buffalo. **Phillipine Journal Veterinary Medicine**, v.10, p.60-4, 1971.
- VIDOTTO, O. **Considerações sobre o estágio evolutivo da larva infestante de *Neoascaris vitulorum* (Goeze 1782) Travassos, 1927, nematódeo parasita de ruminantes**. São Paulo, 1980, 20p. Dissertação (Mestre em Ciências – Área de Parasitologia), Universidade de São Paulo.
- VOLLER, A. et al. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and Practice. **Bulletin World Health Organization**, v. 53, p. 55-65, 1976.
- WALTISBUHL, D. J. et al. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. **Parasitology Research**, v. 73, p.126-31, 1987.
- WARREN, E. G. Nematode larvae in milk. **Australian Veterinary Journal**, v.45, p.388, 1969.
- WARREN, E. G. Studies on the morphology and taxonomy of the genera *Toxocara* Stiles, 1905 and *Neoascaris* Travassos, 1927. **Zoologischer Anzeiger**, v.185, p.393-442, 1970.
- WARREN, E. G. Observations on the migration and development of *Toxocara vitulorum* in natural and experimental hosts. **International Journal for Parasitology**, v.1, p.85-99, 1971.



WHITLOCK, H. V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. **Journal Science Research Australian**, v.21, p.177-80, 1948.



