

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Imunodiagnóstico da ascaridíase humana: uma nova abordagem
sorológica utilizando a tecnologia IgY**

Camila de Almeida Lopes

Uberlândia
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Imunodiagnóstico da ascaridíase humana: uma nova abordagem
sorológica utilizando a tecnologia IgY**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como parte de obtenção do título de
Mestre

Camila de Almeida Lopes

Orientadora: Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz

Uberlândia

2018

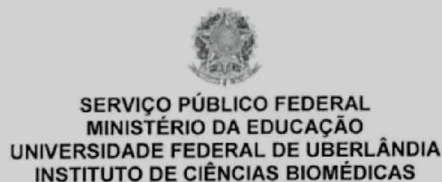
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP) Sistema de Bibliotecas da UFU, MG,
Brasil.

L864i
2018 Lopes, Camila de Almeida, 1993
 Imunodiagnóstico da ascaridíase humana [recurso eletrônico] : uma
 nova abordagem sorológica utilizando a tecnologia IgY / Camila de
 Almeida Lopes. - 2018.

 Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.813>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.

 1. Imunologia. 2. Ascaridíase. 3. Imunodiagnóstico. 4.
 Imunofluorescência. I. Cruz, Julia Maria Costa, (Orient.) II. Universidade
 Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
 Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Camila de Almeida Lopes

“Imunodiagnóstico da ascaridíase humana: uma nova abordagem sorológica utilizando a tecnologia IgY”

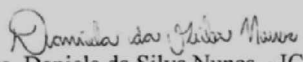
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

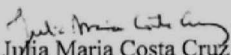
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 27 de julho de 2018.


Prof. Dr. Alvaro Ferreira Júnior – UFG


Dra. Daniela da Silva Nunes – ICIAG/UFU


Profa. Dra. Jufia Maria Costa Cruz (orientadora) – ICBIM/UFU

Aos meus pais e meus avós,

Wagner José Lopes, Andréa Regina de Almeida Lopes, Carlos Luiz de Almeida e Felicita Aparecida Asseli de Almeida pelo amor, carinho, confiança e paciência depositados. Meus exemplos e orgulho de vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que investiram na minha educação, que me deram uma educação de qualidade, que acreditaram que eu pudesse chegar até aqui. À minha irmã, obrigada por estar presente, por sua amizade e companheirismo. Aos meus familiares, agradeço a paciência que tiveram e todo o apoio e incentivo.

Aos meus avós, obrigada por acreditarem em mim, obrigada pelas palavras de encorajamento, obrigada por estarem sempre ao meu lado, mesmo em pensamento. Vocês são meus anjos da guarda.

À minha colega de apartamento, Alessandra Pavolin Pissolati Ferreira, que esteve comigo nesta caminhada desde o primeiro dia em Uberlândia. Muito obrigada pelo seu companheirismo.

À todos os meus amigos de Uberlândia, desde a graduação até a pós-graduação, por todos os momentos compartilhados, sempre cheios de alegria e companheirismo.

À Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz, pela orientação durante todos os anos que passei no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, pela oportunidade, dedicação e confiança durante todo o meu trabalho. Ao Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior pela parceria e toda a ajuda oferecida. À Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno, pela cooperação e solicitude quando eu precisei, abrindo às portas do seu laboratório para eu poder finalizar este trabalho.

Ao Dr. Lucas Silva de Faria, pela ajuda, paciência e por ter confiado em mim. À MSc. Gabriela Borges da Silva, pelos ensinamentos, palavras de encorajamento e principalmente por estar sempre ao meu lado. Você é uma profissional e amiga maravilhosa.

A todos meus amigos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses: Ana Paula Mendes Muniz, Bruna Patrícia Couto, Daniela da Silva Nunes, Dayane Costa, Edson Fernando Goulart de Carvalho, Gabriela Borges da Silva, Guilherme Carrara, Henrique Tomaz Gonzaga, Jéssica Rodrigues, José Eduardo Neto de Sousa, Lucas Silva de Faria,

Luisa Queiroz Corrêa e Renata Araújo Cunha pela amizade e ensinamentos. Muitos já seguiram para outras etapas, mas sempre serão meus amigos de trabalho. Aos funcionários, em especial a Vanessa da Silva Ribeiro, por todo seu apoio técnico. Você foi fundamental na etapa final deste estudo.

Aos membros presentes na avaliação do trabalho, pela disposição e contribuição para o seu melhoramento, em especial ao Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga, Dra. Daniela da Silva Nunes, Prof. Dr. Jonny Yokosawa, Prof. Dr. Álvaro Ferreira-Júnior e Dra. Vanessa da Silva Ribeiro.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelos conhecimentos compartilhados e pela ajuda nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar este projeto e à CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma tiveram participação no decorrer do meu trabalho, agradeço de coração!

LISTA DE ABREVIATURAS

1D – unidimensional

°C – graus Celsius;

% – por cento/porcentagem;

APS – *ammonium persulfate*/persulfato de amônio

ASC – área sob a curva

BSA – *bovine serum albumin*/soroalbumina bovina

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais

CEP – Comissão Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

CH – domínio constante de cadeia pesada da imunoglobulina

Cm – centímetro

CO₂ – dióxido de carbono

CP – cadeia pesada de imunoglobulina

Cut-off – limiar de reatividade, ponto absoluto/ótimo de corte

DAB – diaminobenzidino tetrahydroclorato

DALY – *Disability-Adjusted Life Years*/Anos de vida ajustados por incapacidade

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – densidade óptica

DP – desvio padrão

EDTA – etileno-diamino-tetra-acetato

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

ES – extrato salino total

Es – especificidade

EUA – Estados Unidos da América

F – teste paramétrico *one-way* ANOVA

Fab – fragmento ligante de antígeno

Fc – fragmento cristalizável ligante de componentes do sistema imunológico

FITC – *fluorescein isothiocyanate*/isotiocianato de fluoresceína

g – gravidade

G – gema

GBD – *Global Burden of Disease*

h – hora

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HCl – ácido clorídrico

IA – índice de avidez

IC – intervalo de confiança

ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas

IE – índice ELISA

IgA – imunoglobulina A

IgD – imunoglobulina D

IgE – imunoglobulina E

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IgY – imunoglobulina Y

IL-4 – interleucina 4

IL-5 – interleucina 5

IL-13 – interleucina 13

INGEB – Instituto de Genética e Bioquímica

kDa – kilodalton

Kg – quilogramas

L1 – larva rabditoide de primeiro estágio

L2 – larva rabditoide de segundo estágio

L3 – larvas filariode infectantes de terceiro estágio

L4 – larva de quarto estágio

L5 – larva de quinto estágio

M – molar

min – minutos

ml – mililitro

mM – milimolar

mm – milímetro

NaCl – cloreto de sódio

nm – nanômetro

NTD – *Neglected Tropical Diseases*/ Doenças Tropicais Negligenciadas

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – ortofelinenodiamina

OPG – ovos por gramas de fezes

P – nível de significância

P1 – precipitado rico em lipídeos

P2 – precipitado rico em anticorpos IgY

PBS – *phosphate buffered saline*/solução salina tamponada com fosfato

PBS-T – *phosphate buffered saline – tween*/solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20

PBS-T-M – *phosphate buffered saline – tween – milk*/solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20 e leite desnatado

PCR – *polymerase chain reaction*/reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

PM – peso molecular

m/v – massa por volume

RIFI – reação de imunofluorescência indireta

ROC – *receiver operating characteristic curve*/curva de características de operação do receptor

rpm – rotação por minuto

S1 – fração solúvel rica em proteínas

S2 – sobrenadante descartado após precipitação de proteínas

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*/dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida

Se – sensibilidade

TA – temperatura ambiente

TBS – *tris-buffered saline*/solução tamponada com Tris

TEMED – tetrametiletilenediamino

Th1 – resposta imune do tipo 1

Th2 – resposta imune do tipo 2

Treg – células T regulatórias

Tris – hidroximetil

Tris-HCl – solução de Tris adicionada de HCl

Tween 20 – polioxietilensorbitano-monolaurato

μg – micrograma

μl – microlitro

μm – micrometro

U – ureia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UNIUBE – Universidade de Uberaba

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental dos protocolos de imunização e coleta de ovos e sangue das galinhas. ES: extrato salino total de *Ascaris suum*; ACF: adjuvante completo de Freund; AIF: adjuvante incompleto de Freund.

Figura 2 – (A) Parasitos adultos de *Ascaris suum*; (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) do extrato salino total de fêmea adulta de *A. suum* utilizado nas imunizações das galinhas. Coloração por *Coomassie brilliant blue*. kDa: kiloDalton; P.M.: padrão de peso molecular.

Figura 3 – Etapas do processo de fracionamento dos anticorpos IgY policlonais provenientes das gemas dos ovos das galinhas imunizadas. S1: sobrenadante rico em proteínas; P1: precipitado rico em lipídios; S2: sobrenadante descartado; P2: precipitado rico em anticorpos IgY.

Figura 4 – Cromatograma resultante da purificação dos anticorpos IgY. O pico 2 corresponde aos anticorpos aderidos à coluna cromatográfica (tubos 35 – 50) e o pico 3 corresponde à ovoalbumina, posteriormente descartada.

Figura 5 – (A) Ensaios de *dot-blot* em membranas de nitrocelulose para confirmação da purificação da IgY anti-*Ascaris suum*. IgY +: reação com a adição da amostra de IgY purificada; Controle: reação com adição de BSA 1%. (B) Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12%, sob condições redutoras, das etapas do processo de fracionamento e purificação dos anticorpos. A coloração foi feita com *Coomassie brilliant blue*. P.M.: marcador de peso molecular; G: *pool* de gemas antes do fracionamento; S1: sobrenadante rico em proteínas; P1: precipitado rico em lipídeos; S2: sobrenadante descartado; P2: precipitado rico em anticorpos IgY fracionados; PF: IgY anti-*A. suum* purificada. kDa: kiloDaltons.

Figura 6 – Cinética de produção e ensaios de reatividade cruzada. (A) Avaliação da cinética de produção dos anticorpos IgY fracionados provenientes das gemas dos ovos das galinhas imunizadas e análise da soroconversão por ELISA indireto. (B) Ensaios de ELISA de reatividade cruzada dos anticorpos IgY fracionados provenientes das gemas

contra antígenos de *Ancylostoma ceylanicum* e *Strongyloides venezuelensis*. Linha pontilhada indica o *cut-off* (IE = 1), positivo quando IE > 1,0; setas indicam as semanas das imunizações.

Figura 7 – ELISA de avidéz dos anticorpos IgY fracionados provenientes das gemas dos ovos de galinhas imunizadas com extrato salino total de *Ascaris suum* e tratados com ureia 6 M. Os índices de avidéz (IA%) foram calculados para as semanas que apresentaram índice ELISA (IE) > 1,0 nos ensaios de cinética de produção. Valores foram determinados como baixa (IA < 40%) e alta (IA > 60%) avidéz. A linha pontilhada indica o *cut-off* (60%); setas indicam as semanas das imunizações.

Figura 8 – *Immunoblotting* evidenciando o reconhecimento do perfil proteico do extrato salino total de *Ascaris suum* pelo anticorpo IgY purificado (proveniente da oitava semana); e reação de *immunoblotting* de cinética com o extrato salino total de *A. suum* incubado com seis anticorpos IgY fracionados (pré-imune, segunda semana, quarta semana, sexta semana, oitava semana e décima semana). P.M.: padrão de peso molecular; kDa: kiloDalton. A intensidade das bandas foi analisada pelo programa Image J 1.50i.

Figura 9 – Reação de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos IgY anti-*Ascaris suum* purificados em cortes histológicos da porção posterior de uma fêmea adulta de *A. suum*, e larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum* e *Strongyloides venezuelensis*. Os anticorpos IgY provenientes das galinhas imunizadas com PBS foram utilizados como controle negativo em cortes histológicos de *A. suum*. Coluna **A** (verde): anti-IgY conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC); Coluna **B** (vermelho): contracoloração com azul de Evans; Coluna **C** (*merged*): junção das colunas A e B. Triângulos indicam cutícula; U: parte uterina; E: ovos (*eggs*). Escala das imagens: 200 µm.

Figura 10 – **(A)** ELISA sanduíche para a detecção de imunocomplexos por anticorpos IgY anti-*Ascaris suum* purificados em amostras de indivíduos infectados com *Ascaris* sp. (n = 30), saudáveis (n = 30) ou com outras infecções parasitárias (n = 30). ****: one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($P < 0,0001$); linha tracejada indica o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1; as barras horizontais indicam a média e as verticais

os desvios padrão. **(B)** Curva *receiver operating characteristic* (ROC) indicando o valor do *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es) e área sob a curva (ASC).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Determinação da experimentação animal, coleta de ovos e sangue das galinhas, imunizações com o extrato salino de *Ascaris suum* (n = 2) ou PBS (n = 2); e concentrações dos anticorpos IgY fracionados, obtidos das gemas dos ovos, separados por semana.

SUMÁRIO

RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Morfobiologia de <i>Ascaris lumbricoides</i>	20
1.2 Modo de transmissão e ciclo biológico de <i>Ascaris lumbricoides</i>	21
1.3 Epidemiologia da ascaridíase	23
1.4 Sintomatologia da ascaridíase	24
1.5 Imunologia da ascaridíase	25
1.6 Diagnóstico da ascaridíase	26
1.7 Tecnologia IgY	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Geral	30
2.2 Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Aspectos éticos	31
3.2 Amostras de soros	31
3.3 Obtenção dos adultos de <i>A. suum</i> , das larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> e de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> , e adultos de <i>A. ceylanicum</i>	32
3.4 Animais utilizados	32
3.5 Produção dos extratos salinos totais de adultos de <i>Ascaris suum</i> e <i>Ancylostoma ceylanicum</i> e larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	33
3.6 Produção dos anticorpos IgY policlonais	33
3.6.1 Imunizações dos animais	33
3.6.2 Coleta dos ovos	34
3.6.3 Fracionamento dos anticorpos IgY policlonais	35
3.6.4 Purificação dos anticorpos IgY policlonais	35
3.7 Dot blot para confirmação da presença das imunoglobulinas purificadas	36
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%)	36
3.9 ELISA indireto	37
3.9.1 ELISA indireto para cinética de produção dos anticorpos IgY	37
3.9.2 ELISA de reatividade cruzada	37
3.10 ELISA de avidéz	38

3.11	<i>Immunoblotting</i> unidimensional	38
3.11.1	Reconhecimento do perfil antigênico pela IgY purificada	38
3.11.2	<i>Immunoblotting</i> de cinética	39
3.12	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	39
3.13	ELISA para detecção de imunocomplexos em amostras de soros humanos	40
3.14	Normas de biossegurança	40
3.15	Análise estatística	41
4.	RESULTADOS	42
4.1	Caracterização da preparação antigênica	42
4.2	Imunizações das galinhas e obtenção dos ovos e soro	42
4.3	Fracionamento dos anticorpos IgY policlonais	43
4.4	Purificação dos anticorpos IgY policlonais	44
4.5	Cinética de produção e ensaios de reatividade cruzada	46
4.6	ELISA de avidéz	48
4.7	Reconhecimento das proteínas antigênicas por <i>immunoblotting</i>	49
4.8	Aplicação dos anticorpos IgY purificados em ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI)	51
4.9	Aplicação dos anticorpos IgY purificados em ensaios de ELISA para detecção de imunocomplexos	53
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÃO	59
7.	REFERÊNCIAS	60

RESUMO

A ascaridíase humana é uma doença tropical negligenciada de grande relevância para a saúde pública e é considerada a helmintíase mais frequente em regiões pobres. O diagnóstico preciso desta parasitose tem sido um desafio, devido às limitações dos métodos diagnósticos atuais. A tecnologia IgY (imunoglobulina Y) é uma alternativa para a produção de anticorpos de alto rendimento e específicos, e possui várias vantagens, como por exemplo, a manutenção de galinhas é financeiramente acessível, os animais são facilmente manejados, além de ser uma técnica eficaz. Este estudo teve como objetivo produzir, fracionar, purificar, caracterizar e aplicar anticorpos IgY policlonais anti-*Ascaris suum* no imunodiagnóstico da ascaridíase humana. Cinco imunizações com extrato salino total de adultos de *A. suum* foram realizadas, em intervalos de 14 dias, em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Isa Brown. Os ovos e as amostras de sangue foram coletados semanalmente e quinzenalmente, respectivamente, para monitorar a produção de anticorpos. As imunoglobulinas IgY, obtidas dos ovos, foram purificadas em coluna de afinidade *HiTrap IgY Purification* em sistema completo de cromatografia ÄKTA Prime Plus. A especificidade dos anticorpos foi confirmada por *dot-blot*, SDS-PAGE 12%, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) de cinética, ELISA de avidez, *immunoblotting* e imunofluorescência indireta. A aplicação no diagnóstico foi realizada através da detecção de imunocomplexos, em amostras de soro humano, por ELISA sanduíche. Picos de produção da IgY anti-*A. suum* ocorreram nas semanas seis e oito. Os anticorpos apresentaram altos níveis de avidez após a segunda dose de imunização, variando de 64 a 93%, com índice de avidez médio de 78,30%. A IgY purificada reconheceu 12 bandas proteicas do extrato salino de *A. suum* no ensaio de *immunoblotting*. Os ovos do parasito, a parte uterina e cutículas de fêmea adulta de *A. suum* foram reativas na imunofluorescência. A detecção de imunocomplexos mostrou valores diagnósticos de 80% de sensibilidade e 90% de especificidade. Em conclusão, anticorpos IgY parasito-específicos demonstraram ser uma potencial ferramenta imunodiagnóstica, com promissoras aplicações futuras na terapia da ascaridíase humana.

Palavras-chave: Ascaridíase humana, Imunodiagnóstico, *Immunoblotting*, Imunofluorescência, Imunocomplexo, Tecnologia IgY.

ABSTRACT

Immunodiagnosis of human ascariasis: a new serological approach using IgY technology

Human ascariasis is a neglected tropical disease of great relevance to public health and is considered the most frequent helminthiasis in poor regions. Accurately diagnosing the presence of this parasitosis has been challenging due to limitations of current diagnostic methods. Immunoglobulin Y (IgY) technology is an alternative for the production of highly specific and profitable antibodies with several advantages, i.e. the keeping of chickens is affordable, the animals are easily handled and it is very effective. This study aimed to produce, fractionate, purify, characterize and apply polyclonal IgY antibodies anti-*Ascaris suum* in the immunodiagnosis of human ascariasis. Five immunisations with total saline extract of *A. suum* adult life forms were performed at 14-day intervals in hens (*Gallus gallus domesticus*) of the Isa Brown line. Eggs and blood samples were collected weekly and fortnightly, respectively, to monitor the production of antibodies. IgY immunoglobulin obtained from eggs was purified in a HiTrap IgY Purification affinity column in a complete ÄKTA prime plus chromatography system. The specificity of antibodies was confirmed by dot-blot, SDS-PAGE 12%, kinetic enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), avidity ELISA, immunoblotting and indirect immunofluorescence antibody tests. Application in the diagnosis was performed through detection of immune complexes, in human serum samples, by sandwich ELISA. Peaks of IgY anti-*A. suum* production occurred at six and eight weeks. The antibodies showed high avidity levels after the second dose of immunisation, ranging from 64% to 93% and a mean avidity index of 78.30%. Purified IgY recognised 12 bands of proteins of *A. suum* saline extract in the immunoblotting assay. Eggs, the uterine portion and cuticles of *A. suum* female adult were reactive in immunofluorescence by IgY. The detection of immune complexes showed diagnostic values of 80% sensitivity and 90% specificity. In conclusion, parasite-specific IgY antibodies have been shown to be a potential immunodiagnostic tool with promising future applications in human ascariasis therapy.

Keywords: Human ascariasis, IgY technology, Immune complex, Immunoblotting, Immunodiagnosis, Immunofluorescence.

1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (*Neglected Tropical Diseases* – NTDs) causam alta morbidade, incapacidade e, conseqüentemente, têm elevado impacto socioeconômico (VLAS et al., 2016). As geohelmitíases, infecções parasitárias humanas de grande relevância para a saúde pública, são as NTDs mais predominantes da América Latina e consideradas as infecções mais prevalentes da humanidade (PULLAN; BROOKER, 2012). Dentre os geohelminthos, destacam-se: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomatídeos e *Strongyloides stercoralis*. Estes parasitos são considerados causas de anemia por deficiência de ferro, desnutrição, prejudicam o crescimento e desenvolvimento cognitivo das crianças, causam resultados adversos na gravidez e reduzem o desempenho em adultos (ECHAZÚ et al., 2015; CLAUS et al., 2018).

A ascaridíase humana, causada pelo nematódeo *A. lumbricoides* (Linnaeus, 1758), é uma das parasitoses mais comuns no mundo, apresentando distribuição em mais de 150 países (SILVA; MASSARA, 2016). Dados publicados no *Global Burden Disease Study* (GBD) em 2010, calculam que dentre os 5,19 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY) perdidos para as infecções intestinais causadas por nematódeos, 1,32 milhões são para a ascaridíase (HOTEZ et al., 2014). Outra espécie do gênero *Ascaris* é *Ascaris suum*, (Goeze, 1782) cujos suínos são hospedeiros definitivos, sendo uma parasitose de importância mundial na suinocultura, resultando em perdas econômicas significativas para esta indústria; uma vez que pode prejudicar o processo de absorção intestinal, diminuir os ganhos de massa corporal, diminuir a qualidade da carne ou diminuir o teor de carne na carcaça e interferir na eficácia de vacinas (FRONTERA et al. 2005; DOLD; HOLLAND, 2011; KNECHT; JANKOWSKA; ZALESNY, 2012; VLAMINCK et al., 2014).

Apesar de ambas as espécies demonstrarem forte afinidade por seus hospedeiros convencionais, estudos relacionados à infecção cruzada demonstraram que *A. lumbricoides* tem a habilidade de infectar suínos, e *A. suum*, seres humanos. Em uma pesquisa realizada na Dinamarca, foram encontrados hospedeiros humanos infectados com parasitos de origem suína, indicando estes animais como um potencial reservatório da infecção para a população humana (TAKATA, 1951; GALVIN, 1968). Em países em desenvolvimento, onde ambos hospedeiros partilham a convivência, também é comum encontrar genótipos de *Ascaris* típicos de suínos em humanos. Pode-se interpretar que essa seja uma indicação de que a infecção cruzada também ocorra nessas regiões, e, portanto, há um potencial zoonótico nesses animais (ALVES; CONCEIÇÃO; LELES, 2016).

O diagnóstico da ascaridíase humana é realizado por meio do exame parasitológico, o qual detecta ovos do helminto nas fezes, entretanto possui limitações, uma vez que estes ovos são liberados 60 dias após a infecção (SILVA; MASSARA, 2016; BHARTI; BHARTI; KHURANA, 2017). Desse modo, métodos diagnósticos mais sensíveis são necessários para detectar a infecção por *A. lumbricoides* precocemente.

A imunoglobulina Y (IgY) é o anticorpo mais abundante no sangue e em gemas de ovos de galinhas (*Gallus gallus domesticus*). Além de estar presente no sangue dos animais, é transferida para a gema do ovo, via folículo ovariano, onde é acumulada, conferindo imunidade passiva à embriões e neonatos (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). A produção e a utilização de anticorpos IgY apresentam vantagens sobre os anticorpos IgG de mamíferos, principalmente em relação a grande massa de imunoglobulinas em cada ovo, redução do sofrimento e dano animal por evitar a sangria das galinhas, facilidade no isolamento e fracionamento das gemas, redução no número de animais utilizados e consequentemente redução de despesas (TINI et al., 2002; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

1.1 Morfobiologia de *Ascaris lumbricoides*

O gênero *Ascaris* pertence ao reino Animalia, filo Nematoda, Classe Secernentea, ordem Ascaridida, família Ascarididae, subfamília Ascaridinae (SILVA; MASSARA, 2016; NCBI, 2018). Em *A. lumbricoides*, as formas adultas são longas, robustas, cilíndricas e com extremidades afiladas, sobretudo na região anterior. Este parasito não possui sistema circulatório; e todas as vísceras dos parasitos adultos, incluindo os sistemas digestório, excretor, nervoso e reprodutivo, estão suspensos na cavidade corporal ou pseudoceloma (KHUROO, 1996). O tamanho do parasito depende da carga parasitária e do estado nutricional do indivíduo parasitado, desse modo, as dimensões descritas se referem à nematódeos recolhidos de crianças com baixa carga parasitária e bem nutridas (REY, 2011; SILVA; MASSARA, 2016).

Os machos adultos medem em torno de 20 a 30 cm de comprimento por 2 a 4 mm de largura. Possuem cutícula lisa, brilhante e com finas estriações anulares de coloração branco-marfim ou rosada. Na extremidade anterior encontra-se a boca ou vestíbulo bucal, contornada por três grandes lábios (um dorsal e dois látero-ventrais) providos de papilas sensoriais, com serrilha de denticulos e sem interlábios. Após, estão localizados o esôfago musculoso e o intestino retilíneo e achatado. O reto é envolvido por músculos depressores e se comunica com o exterior por um ânus em forma de fenda transversal. Ao seu entorno agrupam-se numerosas papilas sensoriais. Apresenta testículo filiforme e enovelado, que se diferencia em canal deferente, em seguida têm-se o canal ejaculador que se abre na cloaca. O macho apresenta ainda

dois espículos grossos, curvos e iguais, que podem ser projetados para fora da cloaca ou ficar retraídos, e funcionam como órgãos acessórios da cópula. A extremidade caudal possui um enrolamento ventral, espiralado, e este é o caráter sexual externo de diferenciação da fêmea. Na cauda também são encontradas papilas pré-cloacais e cloacais (REY, 2011; SILVA; MASSARA, 2016).

As fêmeas adultas são maiores e mais grossas que os machos, medindo cerca de 30 a 40 cm de comprimento por 3 a 6 mm de largura. Porém, quando muitas dezenas ou centenas de parasitos ocupam o mesmo habitat, as dimensões reduzem-se, com as fêmeas atingindo de 10 a 15 cm de comprimento. Possuem cutícula, boca e aparelho digestivo semelhantes aos do macho. Grande parte da cavidade pseudocelômica é ocupada pelos órgãos genitais. Possuem dois ovários filiformes e enovelados que se apresentam como um filamento branco longo e delgado que dão sequência a ovidutos, se diferenciando em úteros. Cada útero começa na região posterior do corpo do helminto e se dirige para frente, se unindo em uma única vagina, que se exterioriza pela vulva, localizada no terço anterior do parasito. A abertura vaginal é quase imperceptível e encontra-se na face ventral, sobre a linha mediana. A extremidade posterior da fêmea é retilínea ou ligeiramente curvada (REY, 2011; SILVA; MASSARA, 2016).

Os ovos originalmente são brancos, porém em contato com as fezes adquirem cor castanha. São grandes, em torno de 50 x 60 µm, ovais ou quase esféricos e possuem cápsula espessa, devido a membrana externa mamilonada, que é secretada pela parede uterina e formada por mucopolissacarídeos. A presença dessa membrana facilita a aderência dos ovos a superfícies, propiciando sua disseminação. A esse envoltório seguem-se uma membrana média, constituída por quitina e proteínas, e outra mais interna, delgada e impermeável à água, constituída 25% de proteínas e 75% de lipídios. Essa última camada confere ao ovo grande resistência às condições do ambiente e dessecação. Ainda internamente, o ovo apresenta uma massa de células germinativas. As fêmeas não fecundadas podem eliminar ovos inférteis, portanto incapazes de posterior evolução. Estes são mais alongados (80 a 90 µm de comprimento) e possuem membrana mamilonada mais delgada, camada albuminosa muito reduzida e citoplasma granuloso. Algumas vezes também são encontrados nas fezes ovos férteis, porém com membrana mamilonada ausente (REY, 2011; SILVA; MASSARA, 2016).

1.2 Modo de transmissão e ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*

Ascaris lumbricoides é um nematódeo que habita o trato gastrointestinal do homem e o parasito adulto possui duração de vida em torno de 6 a 18 meses (KHUROO et al., 2016). Em infecções moderadas os adultos são encontrados no intestino delgado, principalmente no jejuno

e íleo; entretanto, em infecções intensas, ocupam todo o órgão (REY, 2011; SILVA; MASSARA, 2016). Podem se fixar à mucosa intestinal com o auxílio dos lábios, migrar pela luz intestinal ou enovelar um verme no outro. A transmissão ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados com ovos férteis do parasito. Muitas vezes, águas de córregos que são utilizadas para a irrigação de hortas estão contaminadas e acarretam na contaminação de verduras com ovos viáveis. Além disso, poeira, aves e insetos são capazes de veicular mecanicamente ovos de *A. lumbricoides*. Geofagia é um fator de risco significativo em crianças, além disso, costumam se infectar ao brincar em solos contaminados, uma vez que suas mãos sujas podem levar os ovos diretamente para a boca ou contaminar brinquedos e objetos que entrarão, posteriormente, em contato com a boca de outras crianças (HALL; HOLLAND, 2000; SCOTT, 2008).

Ascaris lumbricoides é o nematódeo parasito do homem mais comum e abundante e tem um ciclo biológico relativamente simples, do tipo monoxênico. Cada fêmea fecundada é capaz de ovipor cerca de 200.000 ovos por dia, não embrionados, que chegam ao ambiente juntamente com as fezes. O embrionamento dos ovos acontece no meio exterior com o auxílio de solo úmido e sombreado, além da presença de oxigênio, pois nesta fase o parasito utiliza suas reservas lipídicas e apresenta metabolismo anaeróbico. Em temperaturas ótimas, em torno de 25 a 30 °C, o embrionamento pode ocorrer em 15 dias. A primeira larva (L1) formada dentro do ovo é do tipo rabditoide e após uma semana, ainda dentro do ovo, se transforma em larva de segundo estágio (L2) e em seguida sofre nova muda transformando-se em L3 infectante com esôfago filarioide. Os ovos podem permanecer viáveis e infectantes no solo por até 15 anos, podendo ser ingeridos pelo hospedeiro, completando assim o ciclo biológico (REY, 2011; KHUROO et al., 2016; SILVA; MASSARA, 2016; COOPER; HOLLINGSWORTH, 2018).

Após a ingestão, os ovos contendo as L3 atravessam todo o trato gastrointestinal, sendo dissolvidos no estômago devido à ação do suco gástrico, e as larvas são liberadas no intestino delgado. A eclosão das larvas também ocorre devido a estímulos fornecidos pelo próprio hospedeiro, como a presença de agentes redutores, pH, temperatura, sais e a concentração de CO₂, cuja ausência inviabiliza a eclosão. Uma vez liberadas, as larvas alcançam o ceco e penetram através da mucosa, caindo nos vasos linfáticos e na veia mesentérica superior até atingir o fígado entre 18 a 24 horas após a infecção. As larvas aumentam consideravelmente de tamanho, atravessam os sinusoides hepáticos e veias hepáticas, em dois a três dias chegam ao átrio direito pela veia cava inferior e após quatro a cinco dias são encontradas nos pulmões (ciclo de Loss). Cerca de oito dias pós-infecção, as larvas sofrem muda para L4, rompem os capilares e caem nos alvéolos pulmonares, onde sofrem muda para L5. Sobem pela árvore

brônquica e traqueia até atingir a faringe, podendo então ser expelidas ou deglutidas. Ao ser deglutidas, atravessam o estômago e atingem o intestino delgado, transformando-se em adultos entre 20 a 30 dias após a infecção. Em 60 dias alcançam a maturidade sexual, copulam e ovipõem (DOLD; HOLLAND, 2011; REY, 2011; KHUROO et al., 2016; SILVA; MASSARA, 2016; JOURDAN et al., 2017).

1.3 Epidemiologia da ascaridíase

A ascaridíase é possivelmente a primeira helmintíase humana registrada, sendo o parasito *A. lumbricoides* referido em textos da Mesopotâmia, Grécia, Roma e China. Inicialmente, este nematódeo foi confundido com o anelídeo comumente conhecido por minhoca, e descrito como tal pelos gregos e romanos, até que em 1758, Linnaeus descreveu o gênero *Ascaris* (da palavra grega *Askaris*, significando “verme”) (KHUROO, 1996). A epidemiologia da ascaridíase, assim como das demais geohelmintoses, é uma interdependência de fatores humanos (socioeconômicos e culturais), ambientais (temperatura, umidade, tipo de solo) e fatores ligados à biologia do helminto (FORTES et al., 2004).

Atualmente, a ascaridíase humana é uma doença cosmopolita, sendo amplamente distribuída em regiões tropicais e temperadas. Entretanto, a infecção tem maior incidência nos lugares de clima quente e úmido, bem como onde as condições higiênicas da população são mais precárias (SCOTT, 2008). Baixas condições socioeconômicas estão ligadas com uma alta prevalência da ascaridíase; o parasito *A. lumbricoides* é considerado o helminto mais frequente em regiões pobres, com estimativa de prevalência de aproximadamente 25%, ou seja, em torno de 1,4 bilhões de pessoas estão infectadas mundialmente, sendo mais frequente em crianças e adolescentes (KHUROO et al., 2016; SILVA; MASSARA, 2016; JOURDAN et al., 2017; PARIJA; CHIDAMBARAM; MANDAL, 2017).

Cerca de um terço da população em países em desenvolvimento não vivem em locais apropriados e com condições adequadas de higiene, o que pode favorecer a prevalência e a intensidade da infecção por *A. lumbricoides*, devido à presença de condições propícias para a transmissão desta parasitose (CROMPTON; SAVIOLI, 1993). Estima-se que 73% das infecções estão presentes na Ásia, enquanto 12% estão localizadas na África e 8% na América Latina (PETERS, 1978; O’LORCAIN; HOLLAND, 2000). Na África, por exemplo, a prevalência é baixa onde o clima é árido, no entanto, em função do microclima, a prevalência é alta nos oásis, devido às condições quentes e úmidas (O’LORCAIN; HOLLAND, 2000; REY, 2011).

A infecção é atípica em grandes cidades no Continente Europeu, no entanto algumas áreas rurais apresentam alta prevalência. Nos Estados Unidos, em torno de 4 milhões de pessoas estão infectadas, localizadas especialmente em comunidades de imigrantes vindas de países em desenvolvimento (VALENTINE; HOFFNER; HENDERSON, 2001; KHUROO et al., 2016). Inicialmente, no Brasil, utilizando os resultados do inquérito helmintológico realizado por Pellon e Teixeira em 1950, calculou-se a prevalência da ascaridíase na população brasileira em 71,4%. Diversos estudos realizados no nosso país mostraram elevado acometimento dessa parasitose intestinal, com 25% de prevalência em pré-escolares (COSTA-MACEDO et al., 1998), 53,6% em crianças de até 12 anos (SILVA et al., 2011) e 42,3% para mães de lactentes (COSTA-MACEDO; COSTA; ALMEIDA, 1999). Um levantamento realizado por Carvalho et al. (2002) em três mesorregiões do estado de Minas Gerais mostrou que *A. lumbricoides* tem prevalência de 10,3% nesses locais.

1.4 Sintomatologia da ascaridíase

Na maioria dos casos, os indivíduos infectados por *A. lumbricoides* são assintomáticos (VALENTINE; HOFFNER; HENDERSON, 2001), no entanto, em torno de 120 a 220 milhões de pacientes apresentam casos de morbidade associada (DOLD; HOLLAND, 2011). A morbidade e mortalidade aumentam diretamente com a carga parasitária encontrada no hospedeiro. A maioria dos casos de morbidade acontecem em crianças escolares, devido a seus hábitos higiênicos e ao lúmen intestinal ser mais estreito do que em adultos (CROMPTON, 1999; DOLD; HOLLAND, 2011). Indivíduos com infecções de baixa intensidade normalmente são considerados assintomáticos, no entanto, infecções maciças podem levar a lesões hepáticas e pulmonares (SILVA; MASSARA, 2016).

A patogenia da ascaridíase acompanha o ciclo do parasito, ou seja, os efeitos relacionados à infecção diferem ao longo do curso de migração das larvas no hospedeiro e o seu desenvolvimento (DOLD; HOLLAND, 2011; SILVA; MASSARA, 2016). As manifestações clínicas da doença podem ser caracterizadas em sintomas agudos ou crônicos. Durante a passagem das larvas dos pulmões para os alvéolos, os hospedeiros podem experimentar inflamação pulmonar aguda, com ocorrência de vários focos hemorrágicos no órgão, e inchaços dos alvéolos com infiltrado inflamatório por neutrófilos e eosinófilos. Dependendo do número de parasitos presentes, a migração das larvas pelos alvéolos pode acarretar em um quadro pneumônico com febre, tosse, dispneia, bronquite e asma. Na tosse com muco, o catarro pode ser sanguinolento e apresentar larvas do helminto (O’LORCAIN; HOLLAND, 2000; DOLD; HOLLAND, 2011; SILVA; MASSARA, 2016).

Na ascaridíase crônica, a presença de grande número de parasitos no intestino pode ter ação espoliadora, na qual os adultos consomem grande quantidade dos nutrientes do indivíduo, levando o mesmo à subnutrição. Além disso, os helmintos podem enovelar-se na luz intestinal, causando obstrução. Essa obstrução também pode ser complicada com o desenvolvimento de volvulus (obstrução causada por torção ou nó do trato gastrointestinal), volvulus com gangrena e intussuscepção (condição em que parte do intestino sofre uma invaginação) (KANNEGANTI; MAKKER; REMY, 2013). Um agravante nesses pacientes com alta carga parasitária é quando o parasito após alguma ação irritativa, como febre ou uso impróprio de medicamento, desloca-se do seu habitat normal, atingindo outros órgãos; como o trato biliar, causando cólica biliar e colelitíase (CHOI; SEO, 2017; ISMAILI-JAHA et al., 2018); apêndice cecal, causando apendicite; pâncreas, ocasionando a pancreatite; peritônio, levando à um granuloma peritoneal; e ouvido médio. Outros sintomas da infecção crônica por *A. lumbricoides* são distensão abdominal, dor abdominal, cólica, náusea, diarreia, edema e urticária (VALENTINE; HOFFNER; HENDERSON, 2001; LI et al., 2014; ANDRADE et al., 2015; SHAH; SHAHIDULLAH, 2018). A ascaridíase também pode levar à intolerância a lactose e a má absorção de vitamina A e outros nutrientes, o que pode, por sua vez, causar danos nutricionais e falta de crescimento em crianças (BETHONY et al., 2006).

1.5 Imunologia da ascaridíase

A resistência à infecção por *A. lumbricoides* é altamente determinada pela resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. A infecção crônica da ascaridíase induz forte resposta humoral do tipo Th2, caracterizada por níveis elevados de anticorpos específicos e não-específicos de todos os isotipos e subclasses de IgG; interleucinas IL-4, IL-5, e IL-13; e eosinofilia (SCOTT, 2008; COOPER; FIGUIEREDO, 2013). O papel dessa resposta humoral na infecção ainda é controverso; alguns autores sugerem que a resposta com anticorpos parasito-específicos pode conferir um grau de proteção contra a re-infecção, enquanto outros propõem que tal resposta simplesmente reflete a intensidade de infecção do indivíduo, sem nenhum envolvimento de mecanismos protetores (HAGEL et al., 1993; KING et al., 2005). Além dessas opiniões, McSharry et al. (1999) sugerem que a resposta humoral protege o hospedeiro, entretanto, como uma consequência indireta de processos inflamatórios.

Alguns estudos evidenciaram que a resposta Th2 induzida por *A. lumbricoides* ajuda a prevenir e/ou controlar diversas condições atópicas (manifestações clínicas de hipersensibilidade mediadas por IgE) e autoimunes, nas quais a resposta Th1 é considerada patogênica (MOLLER et al., 2007). Algumas explicações sugerem que esse controle pode ser

resultante da regulação cruzada entre os fenótipos dos dois tipos de respostas; ou devido à influência de citocinas T-regulatórias (Treg) (SCHÄFER et al., 2005; SCOTT, 2008).

Embora em muitas infecções a correlação entre os títulos de anticorpos e a produção de ovos não seja identificada, existem evidências que indivíduos com anticorpos específicos para *Ascaris* sp. e citocinas pertencentes à resposta Th2, apresentam baixa porcentagem de ovos por grama de fezes (OPG) (KING et al., 2005). Isso pode sugerir que a contínua exposição ao parasito age como um *booster* para a manutenção de respostas imunes elevadas, e que indivíduos com baixa resposta imune tendem a ter maior liberação de ovos nas fezes, indicando possível debilitação em suas habilidades de controlar a infecção (KING et al., 2005; SCOTT, 2008).

A ascaridíase larval, ocasionada pela migração de larvas pelos órgãos do hospedeiro, é caracterizada por infiltrados inflamatórios compostos por neutrófilos, seguido de eosinófilos e células mononucleadas (NOGUEIRA et al., 2016). Esta resposta imune parece ser protetora para o hospedeiro e concomitante à outras infecções helmínticas. De fato, estudos mostraram que crianças são mais susceptíveis à uma maior prevalência e intensidade da ascaridíase do que adultos; inferindo que uma proteção parcial contra o parasito é adquirida durante os anos (HOLLAND, 2009; COOPER; FIGUIEREDO, 2013).

1.6 Diagnóstico da ascaridíase

O diagnóstico da ascaridíase é realizado pela microscopia óptica, a partir da observação de ovos do parasito nas fezes do hospedeiro através do exame parasitológico de fezes (CLAUS et al., 2018). Porém, não é possível fazer a diferenciação dos ovos de origem humana ou suína, uma vez que eles são idênticos (LELES et al., 2012). Uma vez que as fêmeas liberam milhares de ovos diariamente, não há necessidade de uma metodologia específica, bastando a técnica de sedimentação espontânea (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934). Em inquéritos epidemiológicos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a técnica de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) para a realização do diagnóstico, pois esta permite a quantificação dos ovos e grau de parasitismo dos hospedeiros (SILVA; MASSARA, 2016). Entretanto, o exame parasitológico de fezes não é eficiente na fase pulmonar e no estágio inicial da fase intestinal, devido ao período pré-patente ter cerca de 60 dias (BHARTI; BHARTI; KHURANA, 2017). Em infecções exclusivamente com fêmeas adultas, todos os ovos liberados serão inférteis, enquanto em infecções somente com machos adultos o exame de fezes será negativo (DYBEL et al., 2016; SILVA; MASSARA, 2016). Além disso, em programas de controle de doenças, quando a intensidade da infecção é baixa e infecções leves podem não ser

detectadas após o tratamento (NIKOLAY; BROOKER; PULLAN, 2014), ferramentas mais sensíveis são necessárias para um diagnóstico preciso, de modo que esses programas não acabem antes da eliminação da infecção, uma vez que esses indivíduos podem atuar como reservatórios (WERKMAN et al., 2018).

Menos rotineiramente, larvas de *A. lumbricoides* podem ser encontradas no escarro ou lavagem gástrica, e os adultos podem ser expelidos pela boca ou anus; ademais, o indivíduo pode ser diagnosticado durante o processo de cirurgia abdominal (KHUROO, 1996). Para os casos graves de ascaridíase, pode ser realizado o diagnóstico de imagem, como a ultrassonografia e endoscopia (BETHONY et al., 2006).

Os métodos imunológicos podem ser uma alternativa ao diagnóstico parasitológico; dentre estes testes, pode-se citar o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *immunoblotting* e imunofluorescência indireta (SCOTT, 2008). O método mais utilizado em laboratórios de pesquisa é a reação de ELISA, que se caracteriza pelas interações entre antígeno-anticorpo, podendo ser detectados anticorpos específicos, antígenos parasitários e imunocomplexos circulantes em amostras de soro, saliva, lavado broncoalveolar e fezes. Entretanto, estes testes ainda apresentam algumas limitações, como a reatividade cruzada com outros parasitos (YOSHIDA et al., 2016; JOURDAN et al., 2017; KHURANA; SETHI, 2017).

Outro método que pode ser utilizado é o diagnóstico molecular como o *polymerase chain reaction* (PCR) em tempo real, que se baseia na detecção de DNA de *Ascaris* sp. em amostras fecais (WERKMAN et al., 2018). Este é um método altamente específico e com melhor sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos, no entanto, o método não está disponível em todos os centros de diagnóstico e no momento, é aplicável apenas em situações de pesquisa (JOURDAN et al., 2017).

Desse modo, novas ferramentas de diagnóstico aprimoradas e acessíveis são necessárias para facilitar a detecção de *Ascaris* sp. em indivíduos infectados, incluindo testes de detecção de anticorpos para avaliar a transmissão em áreas de baixa endemicidade, e testes de identificação de antígenos e imunocomplexos para determinar infecções ativas.

1.7 Tecnologia IgY

As imunoglobulinas são proteínas que atuam como componentes críticos em cada estágio da resposta imunológica humoral. Quando expressas nas superfícies dos linfócitos B em repouso, servem de receptores que são capazes de detectar e distinguir uma enorme variedade de antígenos (SOBH; BONILLA, 2016). Existem cinco classes de imunoglobulinas em mamíferos: IgD, IgM, IgG, IgA e IgE. Em aves, existem três classes de imunoglobulinas

análogas a de mamíferos, IgM, IgA e IgY (IgG) (SUGITAKONOSHI, 1996). A IgY é o anticorpo mais produzido em galinhas (*Gallus gallus domesticus*). Além de ser encontrada no sangue desses animais, é transferida para a gema do ovo via folículo ovariano em formação, conferindo imunidade passiva para embriões e neonatos. A IgY é a única imunoglobulina encontrada na gema dos ovos, uma vez que a IgM e IgA estão presentes somente na clara e em pequenas concentrações (DAVIES; PADLAN; SHERIFF, 1990; DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

A estrutura geral da molécula de IgY consiste em duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas, comparável à estrutura básica da imunoglobulina IgG de mamífero. A cadeia pesada contém um domínio variável e quatro domínios constantes, em contraste aos três domínios constantes da cadeia pesada da IgG. A região de dobradiça é menos desenvolvida na IgY, resultando em uma reduzida flexibilidade da região Fab, a qual pode ser a razão para algumas diferenças entre as imunoglobulinas IgY e IgG na ligação do epitopo. Assim como para IgG, a região Fc da IgY é o sítio de função biológica. Contém duas cadeias laterais de carboidratos, em contraste a somente uma na IgG (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995; CHALGHOUMI et al., 2008; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). As IgY apresentam peso molecular aproximado de 180 kilodaltons (kDa), enquanto as moléculas de IgG apresentam peso aproximado de 150 kDa. Em relação ao ponto isoeletrico, os anticorpos IgY situam-se na faixa de pH entre 5,7-7,6, enquanto a IgG se encontra na faixa de pH entre 6,1-8,5 (HATTA et al., 1993; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). A IgY, assim como a IgG, é uma proteína considerada estável; quando diluída em solução salina, adicionada de substâncias que preservam sua estrutura, e liofilizada, sua atividade não é diminuída mesmo após vários meses de estocagem (SHIMIZU et al., 1994; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

Anticorpos IgY já foram utilizados em diferentes aplicações diagnósticas, mostrando alta eficácia contra parasitos como *Toxoplasma gondii* (FERREIRA-JÚNIOR et al., 2012), *Taenia solium* (MANHANI et al., 2011) e *Schistosoma japonicum* (LEI et al., 2012). A tecnologia IgY é uma técnica que apresenta viabilidade econômica quando comparada a outras técnicas utilizadas na extração de anticorpos de mamíferos. As galinhas, animais utilizados nessa técnica, têm baixo custo e são de fácil manipulação; a produção e isolamento de IgY são rápidos e simples, sendo necessária apenas uma pequena quantidade de antígeno na imunização para obter um longo período de títulos de anticorpos; há uma redução do sofrimento e dano animal por evitar a sangria das galinhas; além de ocorrer uma diminuição do número de animais utilizados (CARLANDER et al., 2000; ERHARD et al., 2000; TINI et al., 2002; FERREIRA-JÚNIOR et al., 2012).

Outras características importantes das imunoglobulinas Y são a incapacidade de fixação de moléculas do sistema complemento de mamíferos, a ausência de ligação entre receptores para fragmentos Fc e entre as proteínas estafilocócica A e estreptocócica G. Dessa forma, a utilização de anticorpos IgY pode evitar a ocorrência dos resultados falso-positivos durante a execução de imunoensaios em sistemas utilizando anticorpos de mamíferos (ERHARD; SCHADE, 2001; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010), reforçando a vantagem de utilizar esses anticorpos em ensaios imunológicos.

Com a finalidade de melhorar o diagnóstico da ascaridíase, o presente estudo viabilizou a produção inédita de anticorpos IgY específicos anti-*A. suum*, utilizando a tecnologia de produção de anticorpos IgY, uma vez que ela permite a obtenção de anticorpos com alto grau de especificidade. Os anticorpos produzidos foram purificados e aplicados no reconhecimento de proteínas antigênicas do parasito, em cortes histológicos de formas de vida do parasito e utilizados como ferramenta imunodiagnóstica para a ascaridíase humana.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi produzir, fracionar, purificar, avaliar e utilizar anticorpos IgY provenientes de gemas de ovos de galinhas imunizadas com extrato salino total de adultos de *A. suum*. Os anticorpos foram aplicados no reconhecimento de proteínas antigênicas e formas parasitárias do parasito *A. suum*, e no diagnóstico imunológico da ascaridíase humana.

2.2 Específicos

- Imunizar galinhas de postura com extrato salino total de adulto de *A. suum*;
- Fracionar os anticorpos IgY policlonais por meio do método de diluição por água, provenientes das gemas dos ovos das galinhas imunizadas;
- Purificar os anticorpos IgY por cromatografia líquida de interação tiofílica;
- Avaliar os anticorpos IgY fracionados quanto à especificidade, cinética de produção e maturação de avidéz por ELISA indireto;
- Avaliar o reconhecimento antigênico dos anticorpos IgY purificados e cinética de reconhecimento antigênico dos anticorpos fracionados em ensaios de *immunoblotting* 1D;
- Verificar o reconhecimento de alvos antigênicos em cortes histológicos de fêmea adulta de *A. suum* pela IgY purificada por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI);
- Aplicar os anticorpos IgY purificados na detecção de imunocomplexos em soros de pacientes com ascaridíase humana confirmada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e no Laboratório de Bioquímica e Toxinas de Animais do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB), ambos localizados na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, sob orientação da Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz.

Todos os procedimentos envolvendo os animais experimentais (galinhas, *Gallus gallus domesticus*) foram realizados seguindo as normas recomendadas, após aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais da UFU (CEUA/UFU) sob protocolo de registro CEUA/UFU 097/14. As galinhas foram imunizadas e mantidas no Laboratório de Experimentação Veterinária do Instituto de Estudos Avançados em Veterinária José Caetano Borges da Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba, Minas Gerais, sob responsabilidade do Prof. Dr. Álvaro Ferreira-Júnior.

Para a utilização dos soros humanos aplicados no imunodiagnóstico da ascaridíase, as propostas foram submetidas e aprovadas via Plataforma Brasil sob números de protocolo CAAE: 48492315.8.0000.5152, para os soros armazenados no banco de soros do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses na UFU; e CAAE: 61101916.0.0000.5149 para os soros de pacientes monoparasitados com *Ascaris* sp., cedidos pela Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno, do Laboratório de Genômica de Parasitos, localizado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2 Amostras de soros

Foram utilizadas 90 amostras de soros de humanos, divididos em três grupos:

- **Grupo I** - 30 amostras de soro de pacientes monoparasitados com diagnóstico definitivo para ascaridíase, por métodos parasitológicos de diagnóstico;
- **Grupo II** – 30 amostras de soro de pacientes monoparasitados com outras infecções parasitárias, incluindo ancilostomatídeos (n = 5), *Strongyloides stercoralis* (n = 5), *Schistosoma mansoni* (n = 5), *Taenia* sp. (n = 5), *Enterobius vermicularis* (n = 4), *Entamoeba histolytica/dispar* (n = 3), *Giardia lamblia* (n = 3), confirmados por métodos parasitológicos;

- **Grupo III** - 30 amostras de soros de indivíduos saudáveis, com ausência de sinais clínicos e livres de parasitoses, baseados em exames parasitológicos.

Todas as amostras de soros foram provenientes de indivíduos submetidos a exames parasitológicos, com coleta de pelo menos três amostras, analisadas pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e de sedimentação espontânea (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934).

3.3 Obtenção dos adultos de *A. suum*, das larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e de *Ancylostoma ceylanicum*, e adultos de *A. ceylanicum*

Os parasitos adultos de *A. suum* foram obtidos a partir de um produtor familiar particular de suínos e gentilmente cedidos após o abate de animais infectados, para serem utilizados nesta pesquisa. Após obtenção dos parasitos adultos, a partir de suínos caipiras, estes foram armazenados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a – 20 °C.

As larvas filarioides de *S. venezuelensis* foram obtidas por coprocultura das fezes de ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*. As fezes coletadas foram mantidas em cultura de carvão animal, segundo Loos (NEVES et al., 2016), por três dias a 28°C em estufa BOD (TE 390, Tecnal, Brasil), e recuperadas pelo método de Rugai, Matos e Brisola (1954).

Para obtenção das larvas filarioides de *Ancylostoma ceylanicum*, foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, de quatro semanas, provenientes do Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As fezes dos hamsters infectados foram recolhidas para realização da coprocultura com vermiculita, e foram mantidas a 27 °C durante 7 dias. Após esse período, as larvas filarioides foram recuperadas pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948). Para a recuperação dos adultos de *A. ceylanicum*, os hamsters infectados foram eutanasiados por meio de injeção letal de anestésicos (tiopental sódico 160 mg/kg), 40 dias após a infecção. O intestino delgado foi retirado e aberto longitudinalmente em placa de Petri contendo PBS para obtenção dos parasitos.

3.4 Animais utilizados

Quatro galinhas de postura *Gallus gallus domesticus* da linhagem *Isa Brown*, com 25 semanas de idade, foram utilizadas para a produção dos anticorpos IgY policlonais. As galinhas

foram alojadas individualmente, em gaiolas de arame suspensas, com água e ração *ad libitum* e divididas em dois grupos, com dois animais cada, de acordo com as imunizações:

- **Grupo I (G1)** – duas galinhas imunizadas com extrato salino total de adulto de *Ascaris suum*;
- **Grupo II (controle – G2)** – duas galinhas imunizadas com solução salina (PBS).

3.5 Produção dos extratos salinos totais de adultos de *Ascaris suum* e *Ancylostoma ceylanicum* e larvas filarioides de *S. venezuelensis*

Os extratos salinos totais (ES) foram produzidos a partir de um fragmento de aproximadamente 2 cm proveniente da região posterior de uma fêmea adulta de *A. suum*, de 15 adultos de *Ancylostoma ceylanicum* ou de 300.000 larvas filarioides de *S. venezuelensis*, de acordo com Gonzaga et al. (2013), com algumas modificações. Os parasitos foram ressuspensos em um tubo contendo 5 ml de solução salina (*phosphate buffered saline* – PBS, 0.01 mol/l, pH 7.2) e inibidores de proteases (cOmplete ULTRA mini, Roche, Mannheim, Germany). Após o rompimento com cinco ciclos de maceração manual com o uso de nitrogênio líquido, as suspensões foram centrifugadas (12400 x g, 30 min, 4 °C), e os sobrenadantes (ES) coletados e armazenados a – 20 °C. As proteínas presentes no ES de todos os parasitos foram quantificadas de acordo com o método de Lowry et al. (1951). O perfil de produção antigênica do ES de *Ascaris suum* foi confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) corado com *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (Sigma-Aldrich, EUA) de acordo com a metodologia de Laemmli (1970).

3.6 Produção dos anticorpos IgY policlonais

3.6.1 Imunizações dos animais

As imunizações das galinhas para a obtenção dos anticorpos IgY foram realizadas de acordo com a metodologia de Schwarzkopf et al. (2001). Foram realizadas cinco imunizações com intervalo de 14 dias cada, pela via intramuscular, no músculo peitoral das galinhas. Durante toda a experimentação, os animais foram monitorados para a detecção de processos inflamatórios locais ou apresentação de efeitos adversos na quantidade de ovos produzidos. As imunizações realizadas obedeceram às seguintes administrações:

- **1ª imunização:** volume total de 500 µl (250 µl do ES diluído em PBS com concentração proteica de 100 µg + 250 µl de adjuvante completo de Freund) (Sigma-Aldrich, EUA);
- **2 – 5ª imunizações:** volume total de 500 µl (250 µl do ES diluído em PBS com concentração proteica de 100 µg + 250 µl de adjuvante incompleto de Freund) (Sigma-Aldrich, EUA);

As galinhas do grupo controle (G2) foram inoculadas da mesma forma, exceto pela substituição dos antígenos por PBS. Amostras de sangue foram coletadas dos animais, por meio de punção da veia ulnar (asa), com intervalo de duas semanas, para observação da soroconversão. Os ovos foram coletados semanalmente e armazenados a 4 °C até o processamento.

3.6.2 Coletas dos ovos

A coleta dos ovos foi iniciada uma semana antes da primeira imunização (pré-imune – semana 0) e continuou por mais 10 semanas, totalizando 11 semanas (Fig. 1). Todos os ovos, após a coleta, foram devidamente identificados de acordo com as imunizações, as cascas foram higienizadas com etanol 70% e em seguida, as gemas, contendo a IgY, foram separadas das claras. A membrana vitelínica, ainda intacta, foi lavada com água destilada, rompida, a gema foi vertida em proveta graduada, e conteúdo líquido foi mensurado e utilizado nas etapas seguintes de fracionamento e purificação dos anticorpos. As gemas foram reunidas em um único tubo tipo Falcon para formar um *pool* correspondente à cada semana de imunizações.

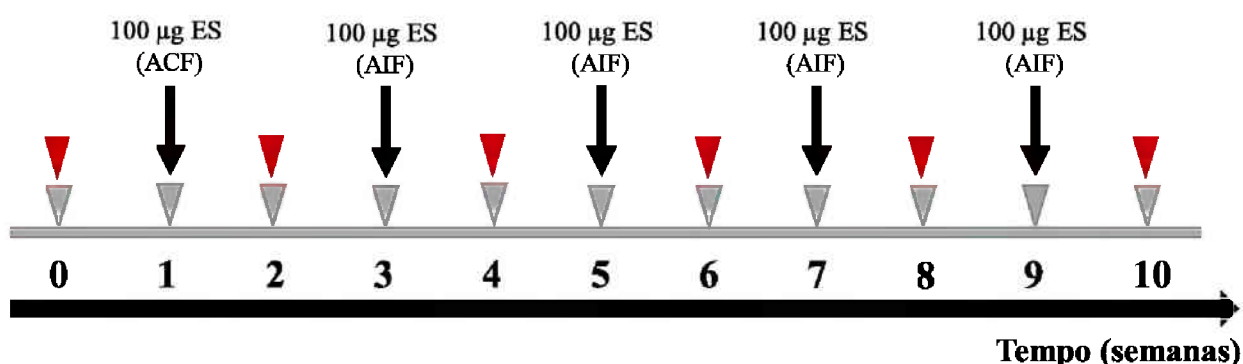


Figura 1 – Desenho experimental dos protocolos de imunização e coleta de ovos e sangue das galinhas. ES: extrato salino total de *Ascaris suum*; ACF: adjuvante completo de Freund; AIF: adjuvante incompleto de Freund.

3.6.3 Fracionamento dos anticorpos IgY policlonais

A primeira etapa de fracionamento dos anticorpos IgY policlonais foi a delipidação das gemas de acordo com o método de diluição por água descrito por Akita & Nakai (1993). Inicialmente, as gemas foram diluídas em água ultrapura (pH 5,0 – 5,2) em proporção de 1:15, o pH foi ajustado para 5,5 com a adição do tampão acetato de sódio (0,06 M, pH 4,8) e a solução foi homogeneizada *overnight* em agitador magnético à 4 °C. Após, a solução foi centrifugada (800 x g, 45 min, 4 °C), o precipitado foi descartado; e o sobrenadante foi coletado, filtrado e teve o pH ajustado para 7,4 por meio da adição de hidróxido de sódio (0,1 M).

A segunda etapa do fracionamento consistiu na precipitação de proteínas da solução delipidizada. Para isso, ao sobrenadante coletado na etapa anterior foi adicionado sulfato de amônio 20% (m/v) (Sigma-Aldrich, EUA). Após homogeneização por 45 min em agitador magnético à 4 °C, a solução foi centrifugada a 2000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em PBS, considerando volume inicial da solução delipidizada, na proporção de 1:10. As amostras fracionadas foram dosadas a 280 nm em um espectrofotômetro (Biodrop μ Lite, Reino Unido).

3.6.4 Purificação dos anticorpos IgY policlonais

Os anticorpos pertencentes à 8ª semana foram purificados, uma vez que apresentaram maiores valores de cinética e avidéz com relação às outras semanas. Para a obtenção dos anticorpos IgY purificados, os precipitados obtidos na última etapa do fracionamento foram submetidos à cromatografia líquida de interação tiofílica em sistema completo ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare, EUA). Os fracionados foram previamente lavados e concentrados em sistema de ultrafiltração (EMD Millipore, EUA), com tampão de fosfato de sódio e sulfato de potássio, utilizando membrana com corte de 30 kDa (AMICON YM 30, EUA). Após a etapa de concentração, as amostras foram inseridas na coluna *HiTrap IgY Purification HP*, 5 ml (GE Healthcare, EUA), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio e sulfato de potássio. Os anticorpos foram eluídos em fluxo de 1 ml/min utilizando gradiente linear de tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5.

Após a purificação, as amostras eluídas foram dialisadas com água ultrapura e submetidas novamente à concentração em sistema de ultrafiltração (EMD Millipore, EUA), com membrana de 30 kDa (AMICON YM 30, EUA). A concentração dos anticorpos foi determinada a 280 nm em espectrofotômetro (Biodrop μ Lite, Reino Unido) e as amostras foram armazenadas à – 20 °C até o uso.

3.7 Dot blot para confirmação da presença das imunoglobulinas purificadas

Após a purificação dos anticorpos, foi realizada a confirmação da presença de IgY na amostra purificada. Para isso, membranas de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha) foram sensibilizadas com 5 µl das amostras purificadas. Após secagem da membrana, em temperatura ambiente (TA), foi realizado bloqueio com PBS acrescido de Tween 20 0,05% e leite desnatado 5% (PBS-T-M 5%) por duas horas em TA, sob agitação lenta. Foram realizadas seis lavagens diretas com PBS acrescido de Tween 20 0,05% (PBS-T). A presença dos anticorpos foi detectada pela adição de anticorpos IgG produzidos em coelhos anti-IgY, conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), na diluição de 1:20.000 em PBS-T acrescido de leite desnatado 1% (PBS-T-M 1%), por duas horas em TA, sob agitação lenta. Após seis lavagens diretas com PBS-T, a reação foi revelada pela adição de 10 mg de 3,3' - diaminobenzidino tetrahydrocloreto (DAB, Sigma-Aldrich, EUA) diluído em 15 ml de solução salina tamponada com Tris (TBS) e 12 µl de peróxido de hidrogênio 30% (Sigma-Aldrich, EUA). A revelação foi interrompida por meio da adição de água destilada. O controle negativo foi realizado com albumina sérica bovina (BSA) 1% nas mesmas condições.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%)

As avaliações dos processos de fracionamento e purificação dos anticorpos IgY foram realizadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições redutoras. Inicialmente, alíquotas de 5 µg das amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM [pH 6,8] + SDS 4% + azul de bromofenol 0,2% + glicerol 20%) com acréscimo de 2-mercaptoetanol 5% (Sigma-Aldrich, EUA). Após, as amostras foram submetidas à fervura por 5 min em banho-maria e adicionadas aos respectivos poços em gel de concentração 12% (tampão Tris-HCl 0,375 M [pH 8,8]; dodecilsulfato de sódio [SDS] 0,1M; EDTA 2 mM; acrilamida/bisacrilamida [29:1]; tetrametiletilenediamino [TEMED] 0,125%; persulfato de amônio [APS] 0,125%). As eletroforeses foram conduzidas em sistema completo vertical [SE 300 miniVE, Hoefer, EUA) com corrente contínua de 20 mA/gel e tampão de corrida Tris-glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 5,5 mM SDS).

Para a identificação dos pesos molares em kiloDaltons (kDa) das bandas polipeptídicas, foi utilizado um marcador padrão de peso molecular (RECOM BLUE Wide Range Protein Marker, Real Biotech, Taiwan), adicionado concomitantemente com as amostras. O gel passou por processo de coloração com *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (Sigma-Aldrich, EUA).

3.9 ELISA indireto

3.9.1 ELISA indireto para cinética de produção dos anticorpos IgY

Para a detecção da cinética de produção de anticorpos IgY anti-*A. suum*, provenientes das gemas dos ovos, foi utilizado o ELISA indireto. A soroconversão dos anticorpos também foi avaliada. Experimentos preliminares foram realizados para determinar as condições ótimas para o teste. Microplacas de poliestireno, baixa afinidade, de 96 poços (Greiner Bio-One, Austria), foram sensibilizadas com 50 µl do ES de *A. suum* (5 µg/ml) diluído em tampão carborato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), e incubadas *overnight* a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes (5 min cada) com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-M 1% por 1 h (IgY proveniente das gemas) ou por 30 min (soro) a 37 °C. Após três lavagens de cinco minutos com PBS-T, amostras de IgY anti-*A. suum* (2 µg/ml) provenientes das gemas, ou as amostras de soros das galinhas (1:200), foram diluídas em PBS-T-M 1%, adicionadas em duplicata (50 µl/poço), e incubadas por 1 h a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e adicionou-se o anticorpo secundário, produzido em coelhos, anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído em uma proporção de 1:20.000 em PBS-T-M 1%, adicionado nos poços (50 µl/poço), e incubado por 1 h a 37 °C. Após novo ciclo de lavagem, a reação foi revelada pela adição de solução cromógena (50 µl/poço) (*o*-fenilenodiamina – OPD) (Sigma-Aldrich Co., USA) acrescida de 10 µl de peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Alemanha), diluídos em 25 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5. Após 8 minutos de incubação, à TA, e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em um leitor de microplacas (Biotek, EUA).

Os valores foram expressos em índice ELISA (IE), calculado pelos valores médios de densidade óptica (DO) das semanas de IgY, divididos pelo *cut-off* mais três desvios padrão. Para estabelecer o valor do *cut-off* para a IgY proveniente das gemas, os valores de DO das seis primeiras semanas de imunização do grupo controle (G2) foram utilizados como controle negativo (n = 6); com relação ao soro, os valores de DO dos soros das galinhas do G2 foram utilizados como controle negativo (n = 6). Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos.

3.9.2 ELISA de reatividade cruzada

A capacidade da IgY anti-*A. suum* detectar antígenos de outros geohelmintos também foi avaliada por meio de ELISA indireto. Para isso, microplacas de poliestireno, baixa afinidade, 96 poços (Greiner Bio-One, Austria), foram sensibilizadas (50 µl/poço) com ES de adultos de *Ancylostoma ceylanicum* (5 µg/ml) ou larvas L3 infectantes de *Strongyloides*

venezuelensis (5 µg/ml). As reações foram conduzidas, reveladas e interrompidas nas mesmas condições que o ELISA indireto do item anterior (3.9.1).

Os valores foram expressos em índice ELISA (IE), calculado pelos valores médios de densidade óptica (DO) das semanas de IgY, divididos pelo *cut-off* mais três desvios padrão. O *cut-off* foi estabelecido como explicado anteriormente. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos.

3.10 ELISA de avidéz

A maturação de avidéz dos anticorpos IgY policlonais provenientes das gemas foi investigada pelo tratamento dos imunocomplexos formados com ureia 6 M, seguida pela determinação da atividade residual por meio de ELISA indireto. Após a etapa de adição e incubação das IgY policlonais (quadruplicata), conforme descrito no item 3.9.1, uma duplicata foi incubada com 50 µl de solução de ureia 6 M (Synth, Brasil) diluída em PBS (pH 7,2), e a outra duplicata incubada com PBS-T, durante 5 minutos em TA. Na sequência, as placas foram lavadas seis vezes diretas com PBS-T. A detecção da atividade residual foi realizada pela incubação com o anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído na proporção de 1:20.000 em PBS-T-M 1%, por 1 h a 37 °C. As etapas seguintes foram realizadas de acordo com o item 3.9.1. O cálculo do índice de avidéz (IA) para cada amostra de IgY, foi realizado por meio da razão entre as DOs obtidas das duplicatas tratadas com ureia (U^+) pelas DOs das duplicatas não tratadas com ureia (U^-), sendo o resultado expresso na forma de porcentagem, conforme a formula: $IA\% = DO\ U^+ / DO\ U^- \times 100$. Os valores foram determinados como baixa ($IA < 40\%$) e alta ($IA > 60\%$) avidéz (VILIBIC-CAVLEK et al., 2016).

3.11 Immunoblotting unidimensional

3.11.1 Reconhecimento do perfil antigênico pela IgY purificada

O reconhecimento do perfil antigênico do ES de *A. suum* pelo anticorpo IgY purificado foi investigado por meio de ensaios de *immunoblotting* unidimensionais. Inicialmente, 250 µg do ES de adulto de *A. suum* foram separadas de acordo com o seu peso molecular através de SDS-PAGE 12%, em condições não redutoras, e logo após foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha), de dimensões: 8 cm de largura x 6 cm de altura, para realização da reação imunológica. A transferência das proteínas para a membrana ocorreu utilizando um sistema de transferência úmido (SE 300 miniVE, Hoefer, EUA) com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol

a 20%), e corrente contínua de 300 mA, por 1 h e 40 min. Após, as membranas foram coradas com solução de Ponceau S (Sigma-Aldrich, EUA) para visualização das bandas proteicas.

Depois da verificação da transferência do antígeno, as membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3 mm de largura. Na sequência, foram bloqueadas com PBS-T-M 5% e incubadas por 2 h à TA, sob agitação lenta. Após o bloqueio, as tiras foram lavadas seis vezes, de cinco minutos cada; o anticorpo IgY anti-*A. suum* purificado (25 µg) foi diluído em PBS-T-M 1%, adicionado, e incubado *overnight*, sob agitação, a 4 °C. Após lavagem com PBS-T, as tiras foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich Co., EUA), diluído em proporção de 1:15.000 em PBS-T-M 1%, por 2 h à TA. A reação foi revelada com a adição de 10 mg de DAB (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em 15 ml de TBS e 12 µl de peróxido de hidrogênio 30% (Sigma-Aldrich, EUA). A revelação foi interrompida por meio da adição de água destilada.

O peso molecular relativo das bandas proteicas foi determinado por meio da comparação com marcador de peso molecular padrão (Real Biotech, RECOM™ Blue Wide Range Prestain Marker, Banqiao, Taiwan) e analisado pelo *software Image J* versão 1.50i (National Institutes of Health, USA).

3.11.2 Immunoblotting de cinética

O reconhecimento do perfil antigênico do ES de *A. suum* pelos anticorpos fracionados foi avaliado através de um *immunoblotting* unidimensional de cinética. Os anticorpos da semana pré-imune, segunda semana, quarta semana, sexta semana, oitava semana e décima semana foram utilizados em membranas de nitrocelulose cortadas em tiras de 3 mm de largura, contendo proteínas do ES de *A. suum*, conforme descrito no item 3.11.1. Todas as etapas do processo foram realizadas de acordo com o item anterior.

3.12 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados para avaliar o reconhecimento de cortes de adultos de *A. suum* por anticorpos IgY purificados anti-*A. suum*. Primeiramente, 1 cm da porção posterior de uma fêmea adulta de *A. suum* foi adicionado em *Tissue-Tek* (Sakura Finetek, Holanda), e congelado a – 20 °C. Após, a estrutura foi cortada em seções de 2 µm de espessura, com o auxílio de um criomicrotomo (Leica CM 1850 UV, Alemanha), e os cortes foram aderidos em lâminas de microscopia.

A reação de imunofluorescência teve início com a adição do anticorpo IgY anti-*A. suum* purificado aos cortes histológicos (380 µg/ml) (50 µl/poço), diluído em PBS, por 30 min, em

câmara úmida, à 37 °C. Após, os cortes foram lavados seis vezes, por 5 min, com PBS, e, então, incubados com o anticorpo secundário produzido em coelhos, anti-IgY conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich, EUA) em proporção de 1:300, diluído em azul de Evans 3% (Vetec, Brasil), por 30 min a 37 °C. Após nova lavagem, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH 9,0) e lamínulas. As imagens dos cortes foram obtidas utilizando microscópio confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Alemanha).

Para avaliar se o anticorpo IgY anti-*A. suum* purificado reagiria cruzadamente, reconhecendo outros helmintos, foram feitas lâminas com cortes histológicos de larvas filarioides de *Ancylostoma ceylanicum* e de *S. venezuelensis*, nas quais a reação foi conduzida nas mesmas condições do *Ascaris suum*.

3.13 ELISA para detecção de imunocomplexos em amostras de soros humanos

Os anticorpos IgY anti-*A. suum* foram avaliados quanto à sua habilidade em detectar imunocomplexos circulantes presentes no soro de pacientes com ascaridíase. O ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno de alta afinidade, 96 poços (Corning-Costar, EUA), sensibilizadas com o anticorpo IgY anti-*A. suum* purificado (30 µg/ml) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), e incubadas *overnight* a 4 °C. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes, 5 min cada, com PBS-T. Em seguida, amostras de soros humanos (positivos para ascaridíase, saudáveis e outras parasitoses) foram adicionadas em proporção 1:100, diluídas em PBS-T, e incubadas por 45 min a 37 °C. Após nova lavagem, foi adicionado o anticorpo secundário, anti-IgG humana, Fc específico, produzido em cabras, conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), em proporção 1:2.000, diluído em PBS-T-M 1%. As etapas seguintes de incubação, lavagens e revelação ocorreram de acordo com as descritas no item 3.9.1. Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / cut-off$. Para o estabelecimento do *cut-off*, foi realizada análise pela curva *receiver operating characteristic* (ROC), utilizando valores de DO das amostras de soro de todos os indivíduos saudáveis e com outras parasitoses, como controle negativo. Os resultados foram considerados positivos quando $IE > 1,0$.

3.14 Normas de biossegurança

Os procedimentos de coleta do sangue e ovos e processamento das amostras de soros e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2009).

3.15 Análise estatística

A média e desvio padrão (DP) foram calculados para o ELISA de avidez. Diferenças entre a detecção dos ES de *A. suum*, *A. ceylanicum* e *S. venezuelensis*, pelas IgY fracionadas, no ELISA indireto, foram analisadas pelo teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os valores de IE das amostras de soro de cada grupo de pacientes foram analisadas pelo teste *one-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. A área sob a curva (ASC), e os valores diagnósticos de sensibilidade (Se) e especificidade (Es), foram obtidos pela curva ROC, para determinação da acurácia diagnóstica do método de ELISA para detecção de imunocomplexos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional *GraphPad Prism* versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., EUA). Significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da preparação antigênica de *A. suum*

A qualidade da preparação do ES de *A. suum* foi avaliada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%), e o perfil antigênico foi evidenciado pela aparição de bandas específicas (Fig. 2B). Após esse processo, as proteínas presentes no ES foram dosadas e apresentaram concentração de 9.000 µg/ml. Em seguida às etapas de caracterização e dosagem, o ES de *A. suum* foi utilizado nos protocolos de imunização das galinhas.

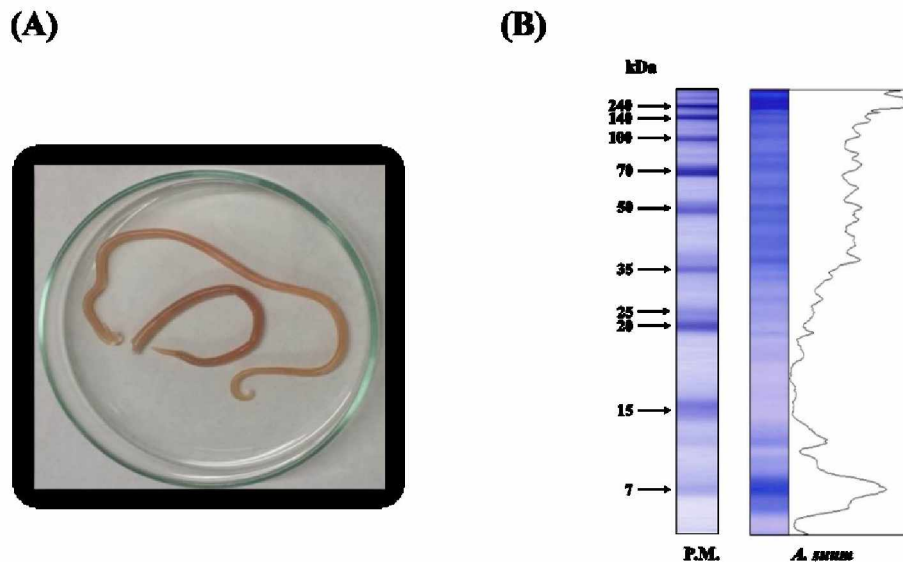


Figura 2 – (A) Parasitos adultos de *Ascaris suum*; (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) do extrato salino total de fêmea adulta de *A. suum* utilizado nas imunizações das galinhas. Coloração por *Coomassie brilliant blue*. kDa: kiloDalton; P.M.: padrão de peso molecular.

4.2 Imunizações das galinhas e obtenção dos ovos e soro

As galinhas imunizadas com os ES de *A. suum* (G1) e PBS (G2) foram monitoradas diariamente. As imunizações foram bem toleradas, não sendo evidenciados processos inflamatórios locais, e a experimentação animal durou 11 semanas (77 dias), como mostrado na Tabela 1. Galinhas de ambos os grupos mantiveram oviposição de 6-12 ovos por semana/grupo; o volume médio do conteúdo das gemas foi de aproximadamente 10 ml/ovo. As gemas foram reunidas para formar um *pool* semanal, para posterior fracionamento dos

anticorpos. A coleta do sangue das galinhas ocorreu em semanas alternadas à imunização dos animais.

4.3 Fracionamento dos anticorpos IgY policlonais

A primeira etapa do fracionamento dos anticorpos IgY policlonais, provenientes da gema dos ovos, aconteceu com a delipidização, ou seja, a retirada da fração lipídica das gemas. Durante essa etapa, o precipitado (P1) foi descartado e formou-se um sobrenadante translúcido rico em proteínas (S1). Deste sobrenadante foi obtido um *pellet* (P2) rico em anticorpos IgY, devido à adição de sulfato de amônio, e o sobrenadante (S2) desta etapa foi descartado (Fig. 3). Cada mililitro de gema fracionada rendeu aproximadamente de 2,2 – 5,6 mg de proteínas precipitadas ao final da segunda etapa (P2) (Tabela 1).



Figura 3 – Etapas do processo de fracionamento dos anticorpos IgY policlonais provenientes das gemas dos ovos das galinhas imunizadas. S1: sobrenadante rico em proteínas; P1: precipitado rico em lipídios; S2: sobrenadante descartado; P2: precipitado rico em anticorpos IgY.

Quadro 1 – Determinação da experimentação animal, coleta de ovos e sangue das galinhas, imunizações com o extrato salino de *Ascaris suum* (n = 2) ou PBS (n = 2); e concentrações dos anticorpos IgY fracionados, obtidos das gemas dos ovos, separados por semana.

Semanas (dias)	Coletas e Imunizações	Rendimento da IgY fracionada obtida da gema dos ovos (µg/ml)
Pré-imune (1-7)	Coleta de ovos e sangue	2222.0
1(8-14)	1ª imunização + coleta de ovos	5113.8
2(15-21)	Coleta de ovos e sangue	5320.4
3(22-28)	2ª imunização + coleta de ovos	5696.0
4(29-35)	Coleta de ovos e sangue	4602.6
5(36-42)	3ª imunização + coleta de ovos	5384.2
6(43-49)	Coleta de ovos e sangue	5055.4
7(50-56)	4ª imunização + coleta de ovos	5112.6
8(57-63)	Coleta de ovos e sangue	4333.4
9(64-70)	5ª imunização + coleta de ovos	4096.0
10(71-77)	Coleta de ovos e sangue	3172.6

4.4 Purificação dos anticorpos IgY policlonais

Após o fracionamento, os anticorpos IgY provenientes da 8ª semana foram submetidos à purificação, por cromatografia de interação tiofílica em sistema completo ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare, EUA). Em cada corrida realizada, foi aplicado 1 ml do dos anticorpos fracionados, os quais foram concentrados anteriormente em sistema de ultrafiltração, gerando 15 tubos (35-50) ricos em anticorpos IgY purificados, de 1 ml cada (Fig. 4). Após, os anticorpos passaram novamente por outro processo de concentração e foram dosados, rendendo 760 µg/ml.

Os anticorpos já purificados e concentrados, foram submetidos à ensaios de *dot-blot*, para confirmação da presença de moléculas IgY (Fig. 5A). A reação ocorreu e a presença dos anticorpos foi visualizada, confirmando desse modo a presença dos anticorpos policlonais anti-*A. suum*. Os anticorpos purificados obtidos foram utilizados nas metodologias de *immunoblotting*, imunofluorescência indireta e ELISA para detecção de imunocomplexos.

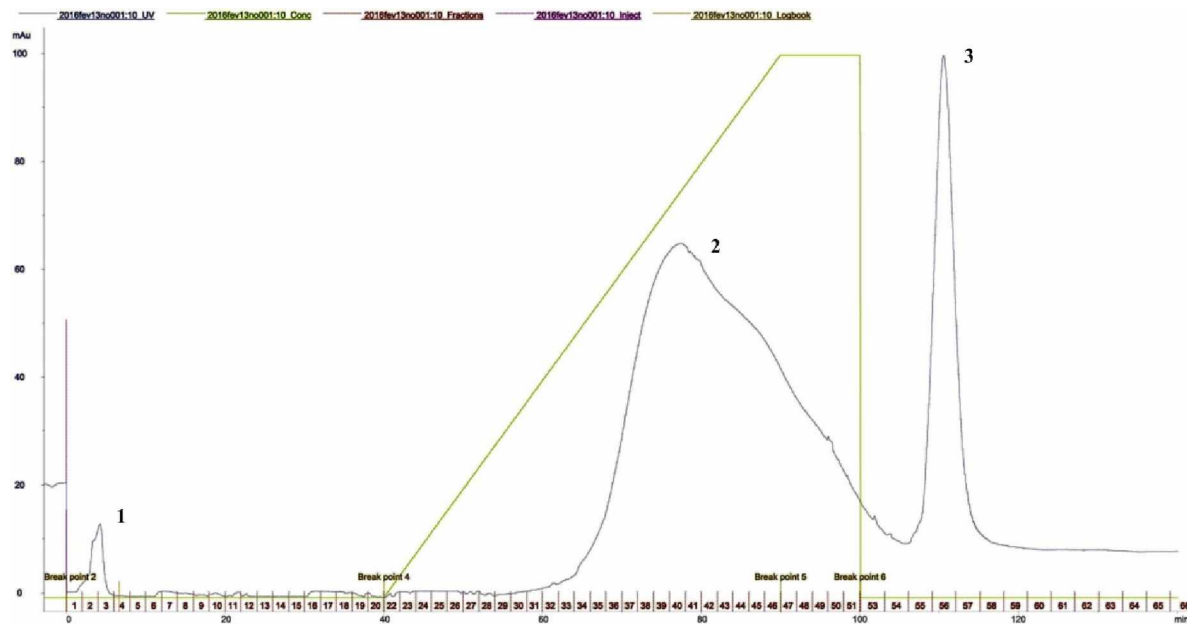
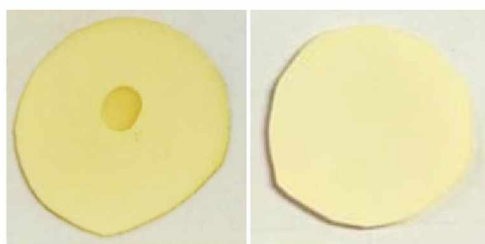


Figura 4 – Cromatograma resultante da purificação dos anticorpos IgY. O pico 2 corresponde aos anticorpos aderidos à coluna cromatográfica (tubos 35 – 50) e o pico 3 corresponde à ovoalbumina, posteriormente descartada.

(A)



IgY +

Controle

(B)

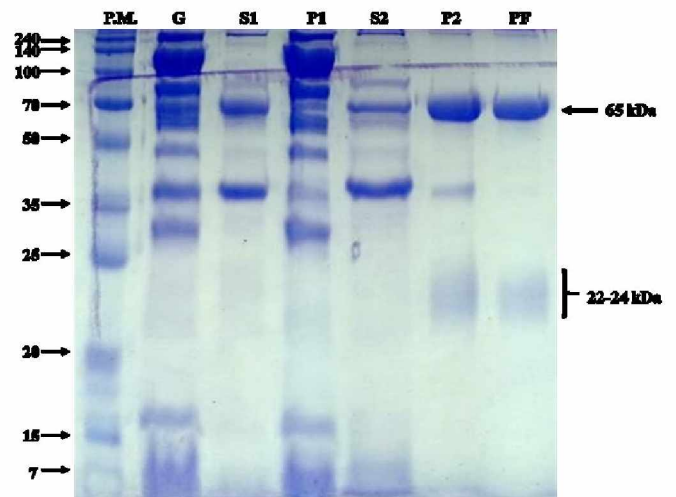


Figura 5 – **(A)** Ensaios de *dot-blot* em membranas de nitrocelulose para confirmação da purificação da IgY anti-*Ascaris suum*. IgY +: reação com a adição da amostra de IgY purificada; Controle: reação com adição de BSA 1%. **(B)** Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12%, sob condições redutoras, das etapas do processo de fracionamento e purificação dos anticorpos. A coloração foi feita com *Coomassie brilliant blue*. P.M.: marcador de peso molecular; G: *pool* de gemas antes do fracionamento; S1: sobrenadante rico em proteínas; P1: precipitado rico em lipídeos; S2: sobrenadante descartado; P2: precipitado rico em anticorpos IgY fracionados; PF: IgY anti-*A. suum* purificada. kDa: kiloDaltons.

A qualidade do processo de purificação dos anticorpos foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) sob condições redutoras. Além do purificado (PF), todas as amostras das etapas do fracionamento também foram submetidas à esse processo de validação (G, S1, P1, S2, P2). O tratamento das amostras com 2-mercaptoetanol 5% fez com que as pontes de dissulfeto entre as cadeias dos anticorpos IgY se quebrassem, permitindo, assim, a comprovação da presença das cadeias pesadas (65 kDa) e leves (22-24 kDa) na fração P2 e no anticorpo purificado (Fig. 5B).

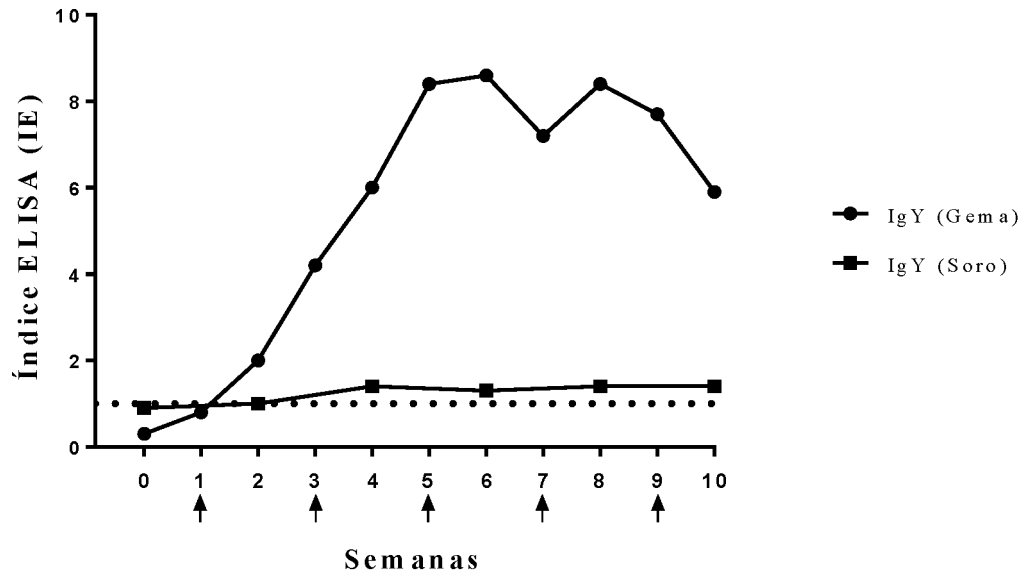
4.5 Cinética de produção e ensaios de reatividade cruzada

Os anticorpos fracionados foram avaliados quanto à sua especificidade ao parasito *A. suum*. A cinética de produção dos anticorpos e sua habilidade em reconhecer outros antígenos foram avaliadas pelo ELISA indireto. Para estes testes, foram utilizadas amostras das semanas dos anticorpos fracionados provenientes das gemas; e no caso da cinética de produção, também foram utilizadas amostras de soros obtidas quinzenalmente dos animais.

Uma semana após a primeira imunização foi possível detectar os anticorpos obtidos das gemas, com picos na sexta e oitava semanas (Fig. 6A). A soroconversão também demonstrou reatividade positiva, tendo um leve aumento no título de detecção dos anticorpos após a segunda dose de imunização, com os níveis permanecendo estáveis durante todo o processo de experimentação animal.

Com relação ao ensaio de reatividade cruzada, a reatividade dos anticorpos IgY fracionados contra o ES de larva infectante de *S. venezuelensis* permaneceram abaixo da linha do *cut-off*, portanto não detectáveis (Fig. 6B). Uma leve reatividade foi observada quando o antígeno de adulto de *Ancylostoma ceylanicum* foi utilizado na sensibilização da reação, sendo detectado pelas semanas 5 – 9 do anticorpo fracionado. Os resultados mostraram que os anticorpos IgY anti-*Ascaris suum* ainda foram altamente específicos contra o ES de *A. suum*, quando comparada a reatividade com outros antígenos de geohelminthos ($F = 30,85$; $P = 0,0002$).

(A)



(B)

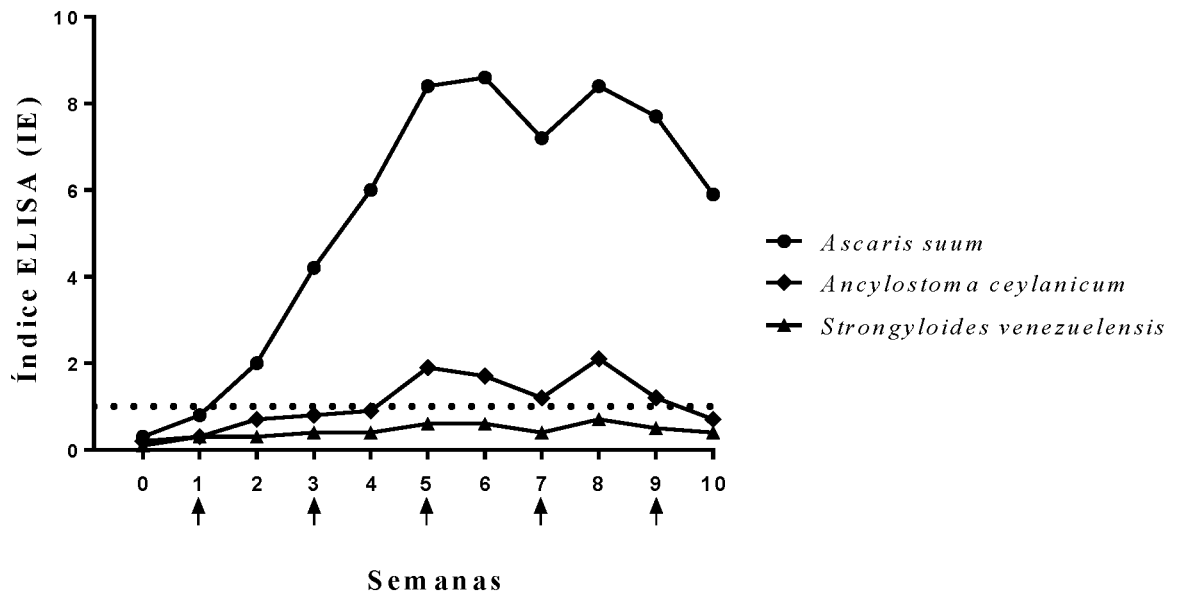


Figura 6 – Cinética de produção e ensaios de reatividade cruzada. (A) Avaliação da cinética de produção dos anticorpos IgY fracionados provenientes das gemas dos ovos das galinhas imunizadas e análise da soroconversão por ELISA indireto. (B) Ensaios de ELISA de reatividade cruzada dos anticorpos IgY fracionados provenientes das gemas contra antígenos de *Ancylostoma ceylanicum* e *Strongyloides venezuelensis*. Linha pontilhada indica o *cut-off* (IE = 1), positivo quando IE > 1,0; setas indicam as semanas das imunizações.

4.6 ELISA de avidéz

O cálculo da avidéz dos anticorpos IgY produzidos pelo fracionamento foi realizado pelo teste ELISA indireto, com os anticorpos provenientes das gemas das semanas que apresentaram cinética de produção positiva, ou seja, $IE > 1,0$. O ELISA demonstrou anticorpos de alta avidéz durante todo o período de imunização, com valores de IA variando entre 64% a 93%, e IA média mostrando alta avidéz de 78,30% (DP 11,20). Os anticorpos fracionados atingiram picos de IA na quinta (90%) e oitava (93%) semanas, com valores maiores de avidéz após a segunda imunização (Fig. 7).

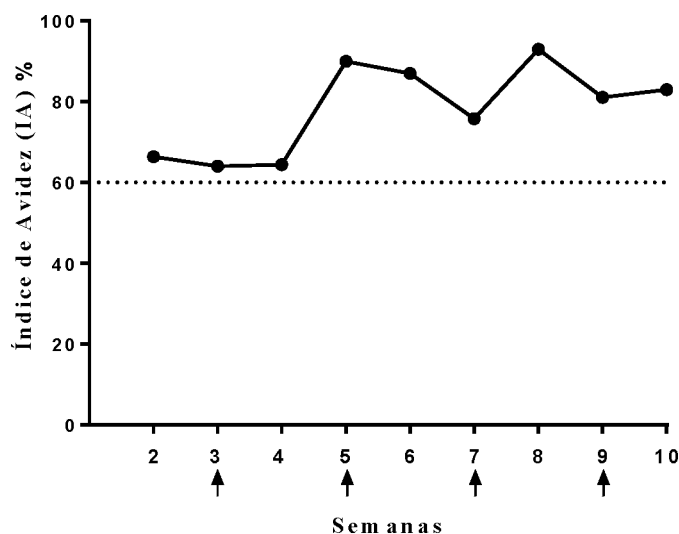


Figura 7 – ELISA de avidéz dos anticorpos IgY fracionados provenientes das gemas dos ovos de galinhas imunizadas com extrato salino total de *Ascaris suum* e tratados com ureia 6 M. Os índices de avidéz (IA%) foram calculados para as semanas que apresentaram índice ELISA ($IE > 1,0$) nos ensaios de cinética de produção. Valores foram determinados como baixa ($IA < 40\%$) e alta ($IA > 60\%$) avidéz. A linha pontilhada indica o *cut-off* (60%); setas indicam as semanas das imunizações.

4.7 Reconhecimento das proteínas antigênicas por *immunoblotting*

O anticorpo IgY purificado, com alto IE e maior IA (8ª semana), produzido foi avaliado no reconhecimento de bandas polipeptídicas do ES de *A. suum* pelo ensaio de *immunoblotting* unidimensional. O anticorpo purificado reconheceu ampla variedade (12 bandas) de proteínas com pesos moleculares aproximados nas regiões de 240, 140, 88, 63, 50, 47, 45, 38, 29, 22, 19 e 15 kDa (Fig. 8). O potencial dos anticorpos fracionados em reconhecer proteínas do ES de *A. suum* também foi avaliado, por meio de ensaio de *immunoblotting* de cinética, e os resultados obtidos foram comparados com os encontrados pelo anticorpo IgY purificado. A figura 8 mostra que anticorpos provenientes das primeiras semanas reconheceram somente a proteína de 240 kDa, com um aumento na reatividade nas semanas seguintes. Os anticorpos que reconheceram um perfil antigênico mais amplo pertenciam à sexta e oitava semanas.

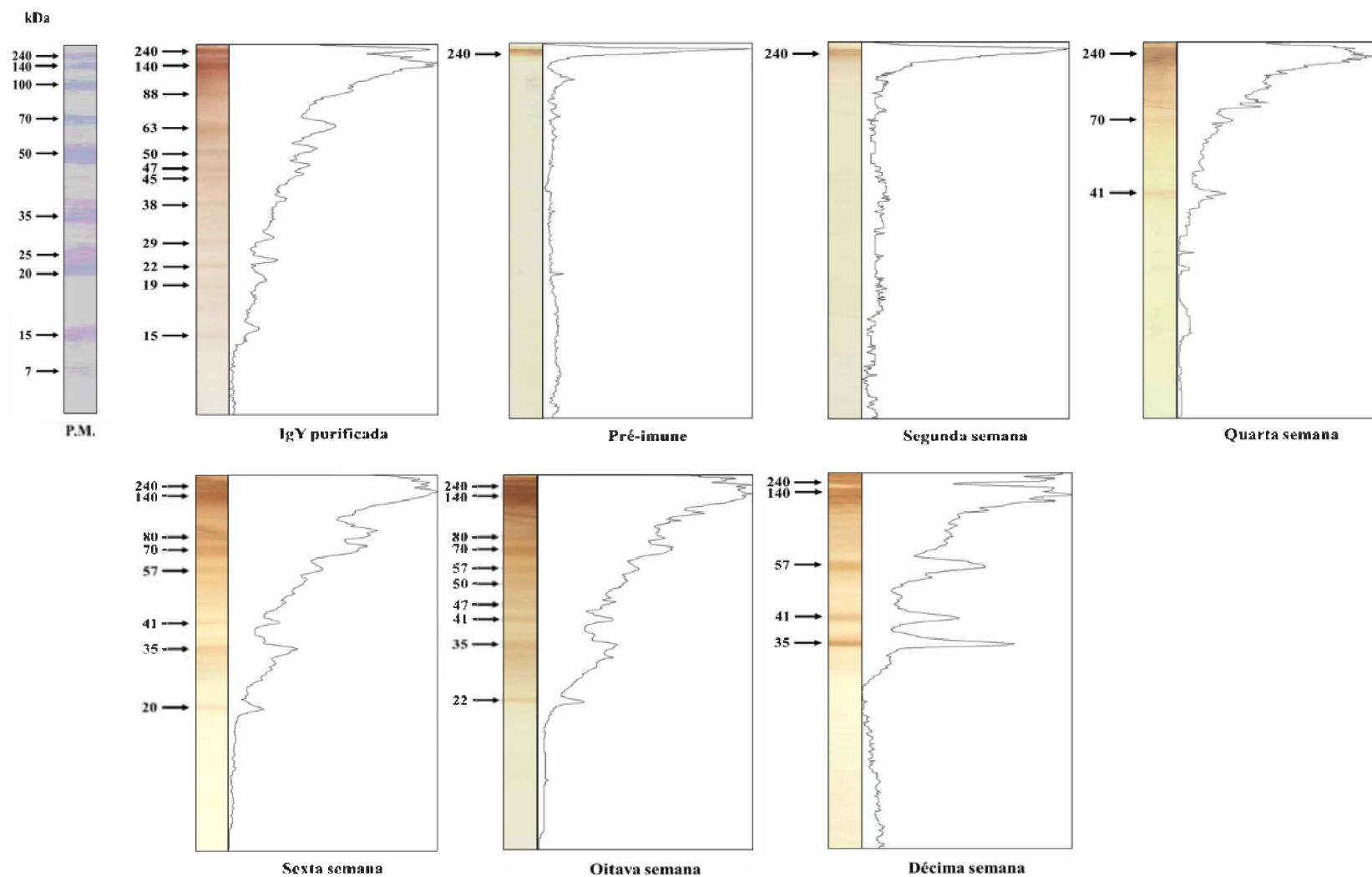


Figura 8 – Immunoblotting evidenciando o reconhecimento do perfil proteico do extrato salino total de *Ascaris suum* pelo anticorpo IgY purificado (proveniente da oitava semana); e reação de *immunoblotting* de cinética com o extrato salino total de *A. suum* incubado com seis anticorpos IgY fracionados (pré-imune, segunda semana, quarta semana, sexta semana, oitava semana e décima semana). P.M.: padrão de peso molecular; kDa: kiloDalton. A intensidade das bandas foi analisada pelo programa Image J 1.50i.

4.8 Aplicação dos anticorpos IgY purificados em ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI)

Os anticorpos IgY anti-*A. suum* purificados foram avaliados quanto ao reconhecimento de cortes histológicos da região posterior de uma fêmea de *A. suum*. Os anticorpos demonstraram reconhecimento do parasito, uma vez que a membrana dos ovos presentes no útero, a parte uterina da fêmea adulta, e sua cutícula reagiram positivamente (Fig. 9). Nos ensaios de reatividade cruzada, a utilização da IgY purificada em cortes histológicos de larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum* e *S. venezuelensis* não apresentaram fluorescência, indicando um reconhecimento nulo dos parasitos pelo anticorpo utilizado. Como controle negativo, os anticorpos IgY purificados obtidos das gemas dos ovos de galinhas inoculadas com PBS, foram utilizados em corte histológico da porção posterior da fêmea de *Ascaris suum*, no qual não foi evidenciado marcações.

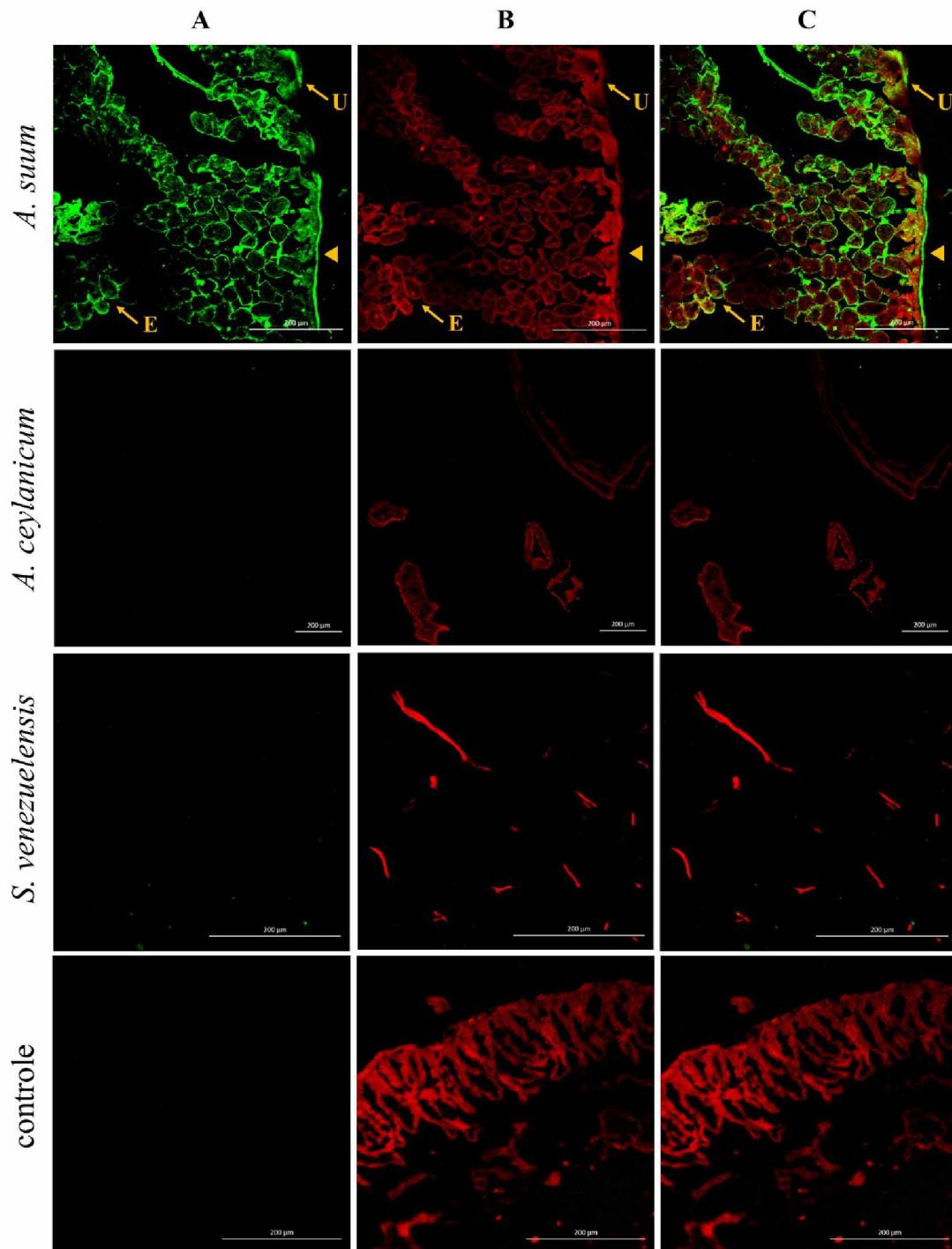


Figura 9 – Reação de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos IgY anti-*Ascaris suum* purificados em cortes histológicos da porção posterior de uma fêmea adulta de *A. suum*, e larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum* e *Strongyloides venezuelensis*. Os anticorpos IgY provenientes das galinhas imunizadas com PBS foram utilizados como controle negativo em cortes histológicos de *A. suum*. Coluna **A** (verde): anti-IgY conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC); Coluna **B** (vermelho): contracoloração com azul de Evans; Coluna **C** (*merged*): junção das colunas A e B. Triângulos indicam cutícula; U: parte uterina; E: ovos (*eggs*). Escala das imagens: 200 µm.

4.9 Aplicação dos anticorpos IgY purificados em ensaios de ELISA para detecção de imunocomplexos

Os anticorpos IgY anti-*A. suum* purificados foram aplicados em ensaios de ELISA sanduíche para a detecção de imunocomplexos circulantes, formados por moléculas de IgG séricas e antígenos parasitários, em soros de indivíduos com *Ascaris* sp., negativos e com outras parasitoses. Os valores de IE analisados entre os três grupos de soros dos indivíduos apresentaram diferença significativa ($F = 45,41$; $P < 0,0001$). O pós-teste utilizado, de múltiplas comparações de Tukey, mostrou que houve diferença estatística quando comparada a média do grupo positivo ($m = 1,517$) com a dos negativos ($m = 0,525$) e de outras parasitoses ($0,737$) ($P < 0,0001$), mas não houve diferença entre as médias dos grupos negativo com outras parasitoses. Amostras de soros que apresentassem $IE > 1,0$ foram consideradas positivas.

Os anticorpos IgY anti-*A. suum* purificados detectaram a presença de imunocomplexos em 80% (24/30) dos indivíduos positivos; em nenhum indivíduo negativo; e em 20% (6/30) dos indivíduos com outras parasitoses, sendo 3/30 (10%) infectados com *Enterobius vermicularis*, e um caso cada (1/30; 3,3%) de ancilostomatídeos, *Entamoeba histolytica/dispar* e *Giardia lamblia*. Os valores diagnósticos de sensibilidade e especificidade foram de 80% (61,43%-92,29%) e 90% (79,49%-96,24%), respectivamente, pontuados a partir do *cut-off* escolhido. A performance do teste, indicada pela área sob a curva (ASC), foi de 0,930 (0,879-0,980).

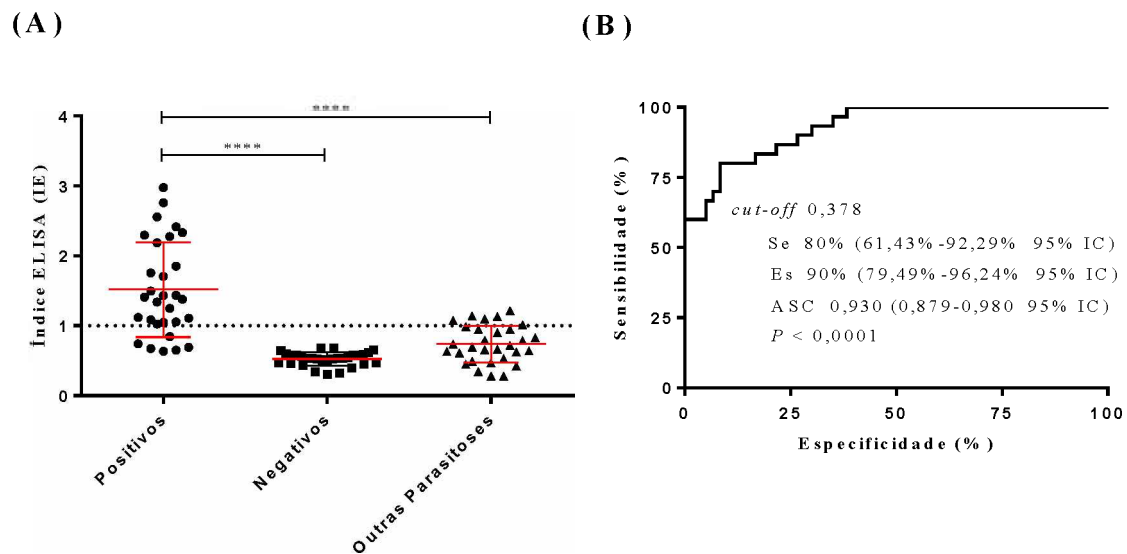


Figura 10 – (A) ELISA sanduíche para a detecção de imunocomplexos por anticorpos IgY anti-*Ascaris suum* purificados em amostras de indivíduos infectados com *Ascaris* sp. (n = 30), saudáveis (n = 30) ou com outras infecções parasitárias (n = 30). ****: one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($P < 0,0001$); linha tracejada indica o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1; as barras horizontais indicam a média e as verticais os desvios padrão. (B) Curva *receiver operating characteristic* (ROC) indicando o valor do *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es) e área sob a curva (ASC).

5 DISCUSSÃO

A imunoglobulina Y (IgY), obtida das gemas de ovos de galinhas, tem atraído atenção considerável ao longo dos anos. Em comparação com a imunoglobulina G (IgG), a tecnologia IgY apresenta várias vantagens, incluindo não ser invasiva, não ativar o sistema complemento dos mamíferos nem os fatores reumatóides dos mesmos, e ainda apresenta alta rentabilidade (CARLANDER et al., 2000). Devido a essas vantagens, a IgY tem sido amplamente utilizada na ciência veterinária e apresenta potencial na aplicação diagnóstica, controle e tratamento de doenças (SALEMI et al., 2015; BORGES et al., 2018). No presente estudo, anticorpos IgY anti-*A. suum* foram produzidos, fracionados, purificados, caracterizados e aplicados pela primeira vez, com o intuito de desenvolver uma nova ferramenta biotecnológica com potencial aplicação em estudos experimentais, imunodiagnóstico e terapia da ascaridíase humana.

Ovos de galinhas imunizadas com diferentes tipos de antígenos representam uma excelente fonte de anticorpos IgY policlonais (BORGES et al., 2018). Neste estudo foram obtidas em torno de 2,2 a 5,6 mg de imunoglobulina Y em cada mililitro de gema de ovo fracionada. Comparando o rendimento dos anticorpos IgY e IgG, adquiridos por métodos convencionais de imunização, 200 mg deste último podem ser obtidas mensalmente, com aproximadamente 5% constituindo o anticorpo específico; enquanto para IgY, 1500 mg podem ser obtidas a cada mês, com 2 a 10% deste valor correspondendo à IgY específica (TINI et al., 2002).

Comparada à produção de anticorpos em coelhos, a tecnologia IgY requer menores volumes de antígeno para obtenção de títulos altos e duradouros do anticorpo proveniente das gemas de galinhas imunizadas (GASSMANN et al., 1990). Este estudo mostrou um aumento nos níveis de IgY logo após a primeira imunização dos animais, permanecendo detectável durante toda a etapa de experimentação animal. O resultado encontrado está em acordo com a literatura, uma vez que a IgY pode ser detectada nas gemas de ovos aproximadamente 4 a 6 dias após a primeira imunização; e o reforço das imunizações pode aumentar fortemente a concentração de anticorpos, mantendo uma detecção de títulos altos de IgY durante um longo período de tempo (GASSMANN et al., 1990; MÜLLER et al., 2015). Além disso, a inoculação do antígeno pela via intramuscular frequentemente resulta em níveis mais altos de anticorpos no dia 28 após a primeira imunização (MUNHOZ et al., 2014), o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo, mostrando um pico na detecção de IgY na quinta semana.

Na literatura é bem elucidado que o uso da IgG de mamíferos em testes imunológicos, e no diagnóstico de geohelmintos pode causar resultados falso-positivos/reatividade cruzada (YOSHIHARAM et al., 1993; MÜLLER et al., 2015; KHURANA; SETHI, 2017). De modo a

avaliar se esta limitação ocorreria com a IgY, os anticorpos fracionados também foram avaliados em teste ELISA de reatividade cruzada contra diferentes geohelminhos: *Ancylostoma ceylanicum* e *S. venezuelensis*. Não foi observada reatividade cruzada com o último parasito, embora o primeiro tenha apresentado baixa positividade durante a detecção entre a quinta e nona semanas. Anticorpos IgY dessas mesmas semanas foram os mais reativos contra o ES de *Ascaris suum*, e a presença de epítomos semelhantes em geohelminhos (KENNEDY et al., 1989) pode explicar a baixa reatividade encontrada com o antígeno de *Ancylostoma ceylanicum*.

A maturação da avidéz de um anticorpo representa uma interação crescente de afinidade entre anticorpos e antígenos (FERREIRA-JÚNIOR et al., 2012). Considerando IA > 60% como alta avidéz (VILIBIC-CAVLEK et al., 2016), ao longo dos estágios de resposta imune das galinhas, houve produção somente de anticorpos de alta avidéz, com IA média de 78,30%, demonstrando, assim, que galinhas imunizadas com o ES de *Ascaris suum* produzem grandes quantidades de anticorpos específicos IgY de alta avidéz apenas uma semana após a primeira imunização. Esse resultado era esperado, uma vez que anticorpos provenientes de galinhas apresentam alta avidéz (10^9 L/mol) após a primeira imunização, enquanto para alcançar esses mesmos valores, uma ovelha, por exemplo, deve receber outras quatro doses de reforço (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

Quando há a necessidade de anticorpos IgY purificados, uma cromatografia de afinidade pode ser utilizada. Portanto, os anticorpos foram purificados em uma coluna *HiTrap IgY Purification* em sistema completo de cromatografia ÄKTA Prime Plus, dialisados, concentrados e utilizados em testes de caracterização e aplicabilidade. A aplicabilidade de anticorpos IgY em ensaios de *immunoblotting* já é bem conhecida (FERREIRA-JÚNIOR et al., 2012) e representa uma possibilidade no campo do imunodiagnóstico da ascaridíase humana. A IgY purificada foi capaz de reconhecer um espectro maior de proteínas antigênicas de *A. suum* quando comparada com os outros anticorpos fracionados. Analisando o padrão de reconhecimento proteico pelos anticorpos fracionados, foi observado que as IgY provenientes da sexta e oitava semana apresentaram maior reatividade. Esse resultado era esperado, uma vez que corrobora com os dados encontrados no ELISA de cinética e de avidéz. Esses resultados mostram a importância da purificação das moléculas de IgY pela cromatografia, uma vez que esses anticorpos específicos apresentaram a característica de reconhecer um perfil proteico mais amplo quando comparados com os anticorpos que não sofreram esse processo. Essa análise de reconhecimento de proteínas antigênicas por ensaios de *immunoblotting* pode ser uma ferramenta útil, por meio de estudos de proteômica, para determinar diferentes fatores de

virulência do *A. suum*, para futuro desenvolvimento de vacinas e métodos diagnósticos (FERREIRA-JÚNIOR et al., 2012).

Um método sensível para a caracterizar a IgY é por intermédio da identificação do parasito por técnicas de imunofluorescência (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010). A IgY purificada reconheceu cortes histológicos da região posterior de uma fêmea adulta de *A. suum*. A reatividade cruzada com *Ancylostoma ceylanicum* e *S. venezuelensis* também foi avaliada em cortes histológicos de ambos parasitos, não sendo evidenciada nenhuma reatividade da IgY. Desse modo, a IgY purificada em coluna de afinidade foi utilizada com sucesso na reação de imunofluorescência indireta, não mostrando sinais de reatividade cruzada da IgY com os outros geohelminthos. Portanto, a técnica de imunofluorescência indireta juntamente com anticorpos IgY anti-*Ascaris suum* podem ser utilizados como uma ferramenta diagnóstica para a ascaridíase.

Imunocomplexos são formados a partir da ligação de antígenos parasitários a anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro (GONÇALVES et al., 2012). Após o estímulo antigênico, os anticorpos produzidos se combinam com os determinantes antigênicos, formando então, imunocomplexos circulantes. Este processo é um importante mecanismo de defesa do organismo, pois possibilita a neutralização, eliminação e inativação de antígenos impedindo que sejam depositados e que causem danos aos tecidos do hospedeiro (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997). Testes diagnósticos com alta sensibilidade e especificidade são extremamente importantes, uma vez que estamos seguindo em direção à interrupção da transmissão de doenças tropicais negligenciadas, na qual a ascaridíase está inclusa. Entretanto, atualmente não existem métodos “padrão-ouro” para a detecção dessas infecções, além dos métodos parasitológicos de microscopia, que apresentam várias limitações (WERKMAN et al., 2018).

No presente estudo, os anticorpos IgY purificados foram avaliados como ferramenta diagnóstica na detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soros de indivíduos monoparasitados com *Ascaris* sp., negativos e infectados com outras parasitoses. O teste apresentou valores altos de sensibilidade (80%) e especificidade (90%); e o anticorpo purificado detectou 80% das amostras dos indivíduos positivos, com somente 6/30 indivíduos apresentando títulos baixos de imunocomplexo. No entanto, foram reconhecidos 6/30 indivíduos falso-positivos no grupo de outras parasitoses, desses seis, quatro eram amostras de indivíduos infectados com helmintos, e duas de indivíduos com infecções por protozoários. Contudo, os resultados estatísticos mostraram que os anticorpos IgY anti-*A. suum* ainda foram altamente específicos para a detecção de imunocomplexos em amostras de indivíduos positivos,

quando comparado com os outros dois grupos ($F = 45,41$; $P < 0,0001$). A ausência de detecção de imunocomplexos nos soros dos indivíduos positivos para a ascaridíase pode ser justificada, uma vez que imunocomplexos muito pequenos ou muito grandes são facilmente eliminados, enquanto que aqueles de tamanho intermediário podem, dependendo do antígeno e/ou anticorpo, ser mais susceptíveis à deposição nos tecidos e não estarem circulantes (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997). Assim, em qualquer destas situações os imunocomplexos não serão detectáveis no soro.

A produção de anticorpos IgY é uma alternativa aos métodos diagnósticos atuais da ascaridíase. Anticorpos aviários possuem muitas vantagens imunológicas sobre os anticorpos IgG de mamíferos: a manutenção das galinhas é economicamente viável, os animais são facilmente manipulados, além de ser uma técnica muito eficaz (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010). Como foi mostrado neste estudo, os títulos de detecção da IgY permaneceram altos por um longo período de tempo. Outra vantagem decorre da distância evolutiva entre as proteínas das aves e dos mamíferos, possibilitando a aplicação da tecnologia IgY em pesquisas, diagnósticos e terapia (ZHANG et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

- Galinhas de postura imunizadas com ES de fêmea adulta de *A. suum* produziram anticorpos com alta rentabilidade, especificidade e avides;
- O fracionamento de anticorpos IgY policlonais, provenientes das gemas dos ovos das galinhas imunizadas, pelo método de diluição por água e consequente purificação por cromatografia líquida de interação tiofílica proporcionaram a obtenção de anticorpos altamente purificados e com alta rentabilidade;
- Os anticorpos IgY anti-*A. suum* foram capazes de produzir anticorpos específicos logo após a primeira dose de imunização, com picos de produção na sexta e oitava semanas, mantendo níveis detectáveis por um longo período de tempo;
- Os anticorpos IgY anti-*A. suum* produzidos apresentaram alta avides durante todo o período de experimentação animal, com IA médio de 78,30%;
- Os anticorpos IgY anti-*A. suum* purificados reconheceram um amplo perfil proteico antigênico (12 bandas polipeptídicas) do ES de *A. suum* na reação de *immunoblotting* unidimensional;
- Os anticorpos IgY anti-*A. suum* purificados reconheceram ovos de *A. suum*, a parte uterina e a cutícula de uma fêmea adulta de *A. suum* em cortes histológicos do parasito na reação de imunofluorescência indireta (RIFI);
- Os anticorpos IgY anti-*A. suum* purificados foram eficazes como ferramenta imunodiagnóstica para a ascaridíase humana na detecção de imunocomplexos circulantes em soros de pacientes positivos, diferenciando-os dos grupos de indivíduos saudáveis e de pacientes com outras parasitoses.

7 REFERÊNCIAS

- AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with a enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v. 2, p. 207-214, 1993.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90179-B](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-B)
- ALVES, E. B. S.; CONCEIÇÃO, M. J.; LELES, D. *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* or “*Ascaris lumbricoides*”? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, p.1355, 2016.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiw027>
- ANDRADE, A. M.; PEREZ, Y.; LOPEZ, C.; COLLAZOS, S. S.; ANDRADE, A. M.; RAMIREZ, G. O.; ANDRADE, L. M. Intestinal obstruction in a 3-year-old girl by *Ascaris lumbricoides* infestation. **Medicine**, v. 94, p.1-3, 2015.
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000655>
- BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffinding von *Ankylostomum* (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. Mit H. Geneesk. **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.
- BETHONY, J. R.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S. M.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P. J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, p. 1521-1532, 2006
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)
- BHARTI, B.; BHARTI, S.; KHURANA, S. Worm infestation: diagnosis, treatment and prevention. **Indian Journal of Pediatrics**, p. 1-8, 2017.
<https://doi.org/10.1007/s12098-017-2505-z>
- BORGES, I. P.; SILVA, M. F.; SANTIAGO, F. M.; DE FARIA, L. S.; FERREIRA-JÚNIOR, A.; SILVA, R. J.; COSTA, M. S.; DE FREITAS, V.; YONEYAMA, K. A. G.; FERRO, E. A. V.; LOPES, D. S.; RODRIGUES, R. S.; DE MELO RODRIGUES, V. Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 333-342, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.178>
- CARLANDER, C.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P. E.; LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunology Research**, v. 21, p. 1-6. 2000.
<https://doi.org/10.1385/IR:21:1:1>
- CARVALHO, O. S.; GUERRA, H. L.; CAMPOS, Y. R.; CALDEIRA, R. L.; MASSARA, C. L. Prevalência de helmintos intestinais em três mesorregiões do estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 597-600, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000600009>
- CHALGHOUMI, R.; THEWIS, A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. **Poultry Science**, v.87, p. 32-40, 2008.
<https://doi.org/10.3382/ps.2007-00252>

CHOI, J. H.; SEO, M. A case of biliary ascariasis in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 55, p. 659-660, 2017.
<https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.6.659>

CLAUS, P.; CEUPPENS, A.; COOL, M.; ALLIET, G. *Ascaris lumbricoides*: challenges in diagnosis, treatment and prevention strategies in a European refugee camp. **Acta Clinica Belgica**, v. 19, p. 1-4, 2018.
<https://doi.org/10.1080/17843286.2018.1436956>

COOPER, A. J.; HOLLINGSWORTH, T. D. The impact of seasonality on the dynamics and control of *Ascaris lumbricoides* infections. **Journal of Theoretical Biology**, v. 453, p. 96-107, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.05.025>

COOPER, P. J.; FIGUIEREDO, C. A. Immunology of *Ascaris* and Immunomodulation. In: HOLLAND, C. **Ascaris – the neglected parasite**. Dublin: Academic Press, 1996. p. 4-13.

COSTA-MACEDO, L. M.; MACHADO-SILVA, J. R.; RODRIGUES-SILVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; VIANNA, M. S. R. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, p. 851-855, 1998.
<https://doi.org/10.1590/S0102-311X1998000400027>

COSTA-MACEDO, L. M.; COSTA, M. C. E.; ALMEIDA, L. M. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* em crianças menores de dois anos: estudo populacional em comunidade do estado do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, p.173-178, 1999.
<https://doi.org/10.1590/S0102-311X1999000100017>

CROMPTON, D. W. T. How much human helminthiasis is there in the world? **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 397-403, 1999.
<https://doi.org/10.2307/3285768>

CROMPTON, D. W.; SAVIOLI, L. Intestinal parasitic infections and urbanization. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 71, p. 1-7, 1993.

DAVIES, D. R.; PADLAN, E. A.; SHERIFF, S. Antibody-antigen complexes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 439-473, 1990.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.002255>

DAVISON, F.; MAGOR, K. E.; KASPERS, B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**. Elsevier: San Diego, 2008. p. 481.
<https://doi.org/10.1016/B978-012370634-8.50009-3>

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, S. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, p. 173-180, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.011>

DOLD, C.; HOLLAND, C. V. *Ascaris* and ascariasis. **Microbes and Infection**, v. 13, p.632-637, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.012>

DYBEL, J.; KARAMON, J.; RÓZIKI, M.; BILSKA-ZAJAC, E.; KLAPEC, T.; CENCEK, T. Characterization of a new, highly effective method for detecting nematode eggs (*Ascaris* spp., *Toxocara* spp., *Trichuris* spp.) in sewage sludge containing flocculants. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 198-206, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.011>

ECHAZÚ, A.; BONANNO, D.; JUAREZ, M.; CAJAL, S. P.; HEREDIA, V.; CAROPRESI, S.; CIMINO, R. O.; CARO, N.; VARGAS, P. A.; PAREDES, G. KROLEWIECKI, A. J. Effect of poor access to water and sanitation as risk factors for soil-transmitted helminth infection: selectiveness by the infective route. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, e0004111, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004111>

ERHARD, M. H.; SCHMIDT, P.; ZINSMEISTER, P.; HOFMANN, A.; MÜNSTER, U.; KASPERS, B.; WIESMÜLLER, K. H.; BESSLER, W. G.; STANGASSINGER, M. Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens. **Poultry Science**, v. 79, p. 1264-1270, 2000.

<https://doi.org/10.1093/ps/79.9.1264>

ERHARD, M.; SCHADE, R. Short introduction to hen's humoral immune system. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk: antibodies, production and application – Igy-Technology**. Springer-Verlag, Berlin, 2001. p. 255.

https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9_1

FERREIRA-JÚNIOR, A.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; MACÊDO JÚNIOR, A. V.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; SILVA FILHO, H. H.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P. Production, characterization and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **PLoS One**, v. 7, p. e40391, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040391>

FORTES, B. P. M. D.; VALENCIA, L. I. O.; RIBEIRO, S. V.; MEDRONHO, R. A. Modelagem geoestatística da infecção por *Ascaris lumbricoides*. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, p.727-734, 2004.

<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000300009>

FRONTERA, E.; ALCAIDE, M.; DOMÍNGUEZ-ALPÍZAR, J. L.; BOES, J.; REINA, D.; NAVARRETE, I. Evidence of interaction between *Ascaris suum* and *Metastrongylus apri* in experimentally infected pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p.295-301, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.001>

GALVIN, T. J. Development of human and pig *Ascaris* in the pig and rabbit. **Journal of Parasitology**, v. 54, p.1085-1091, 1968.

<https://doi.org/10.2307/3276967>

GASSMANN, M.; THÖMMES, P.; WEISER, T.; HÜBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB Journal**, v. 4, p. 2528-2532, 1990.

<https://doi.org/10.1096/fasebj.4.8.1970792>

GONÇALVES, A. L. R.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Experimental Parasitology**, v.130, n.3, p. 205-208, 2012b.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.007>

GONZAGA, H. T.; VILA-VERDE, C.; NUNES, D. S.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; COSTA-CRUZ, J. M. Ion-exchange protocol to obtain antigenic fractions with potential for serodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 140, p. 69-75, 2013.

<https://doi.org/10.1017/S0031182012001230>

HAGEL, I.; LYNCH, N. R.; DI PRISCO, M. C.; PEREZ, M.; ROJAS, E.; ALVAREZ, N. *Ascaris* reinfection of slum children: relation with the IgE response. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 94, p. 80-83, 1993.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1993.tb05981.x>

HALL, A.; HOLLAND, C. Geographical variation in *Ascaris lumbricoides* fecundity and its implications for helminth control. **Parasitology Today**, v. 16, p. 540-544, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01779-8](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01779-8)

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG.

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 57, p. 450-454, 1993.

<https://doi.org/10.1271/bbb.57.450>

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis *mansoni*. Puerto Rico. **Journal of Public Health Tropical Medicine**, v.9, p.283-291, 1934.

HOLLAND, C. V. Predisposition to ascariasis: patterns, mechanisms and implications. **Parasitology**, v. 136, p. 1537-1547, 2009.

<https://doi.org/10.1017/S0031182009005952>

HOTEZ, P. J.; ALVARADO, M.; BASÁÑEZ, M. G.; BOLLIGER, I.; BOURNE, R.; BOUSSINESQ, M.; BROOKER, S. J.; BROWN, A. S.; BUCKLE, G.; BUDKE, C. M.; CARABIN, H.; COFFENG, L. E.; FÈVRE, E. M.; FÜRST, T.; HALASA, Y. A.; JASRASARIA, R.; JOHNS, N. E.; KEISER, J.; KING, C. H.; LOZANO, R.; MURDOCH, M. E.; O'HANLON, S.; PION, S. D. S.; PULLAN, R. L.; RAMAIAH, K. D.; ROBERTS, T.; SHEPARD, D. S.; SMITH, J. L.; STOLK, W. A.; UNDURRAGA, E. A.; UTZINGER, J.; WANG, M.; MURRAY, C. J. L.; NAGHAVI, M. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e2865, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>

ISMAILI-JAHA, V.; TORO, H.; SPAHIU, L.; AZEMI, M.; HOXHA-KAMBERI, T.; AVDIU, M.; SPAHIU-KONJUSHA, S.; JAHA, L. Gallbladder ascariasis in Kosovo – focus

on ultrasound and conservative therapy: a case series. **Journal of Medical Case Reports**, v. 12, p. 8-12, 2018.

<https://doi.org/10.1186/s13256-017-1536-4>

JOURDAN, P. M.; LAMBERTON, P. H.; FENWICK, A.; ADDISS, D. G. Soil-transmitted helminth infections. **Lancet**, v. 391, p. 252-265, 2017.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31930-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31930-X)

KANNEGANTI, K.; MAKKER, J. S.; REMY, P. *Ascaris lumbricoides*: to expect the unexpected during a routine colonoscopy. **Case Reports in Medicine**, v. 2013, p. 4, 2013.

<https://doi.org/10.1155/2013/579464>

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H. LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, 2004.

<https://doi.org/10.1079/WPS200422>

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 397-400, 1972.

KENNEDY, M. W.; QURESHI, F.; FRASER, E. M.; HASWELL-ELKINS, M. R.; ELKINS, D. B.; SMITH, H. V. Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, and *Toxocara canis*. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 75, p. 493-500, 1989.

KHURANA, S.; SETHI, S. Laboratory diagnosis of soil-transmitted helminthiasis. **Tropical Parasitology**, v. 7, p. 86-91, 2017.

https://doi.org/10.4103/tp.TP_29_17

KHURROO, M. S. Ascariasis. **Parasitic Diseases of the Liver and Intestines**, v. 25, p. 553-577, 1996.

[https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(05\)70263-6](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(05)70263-6)

KHURROO, M. S.; RATHER, A. A.; KHURROO, N. S.; KHURROO, M. S. Hepatobiliary and pancreatic ascariasis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, p. 7507-7517, 2016.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i33.7507>

KING, E. M.; KIM, H. T.; DANG, N. T.; MICHAEL, E.; DRAKE, L.; NEEDHAM, C.; HAQUE, R.; BUNDY, D. A.; WEBSTER, J. P. Immuno-epidemiology of *Ascaris lumbricoides* infection in a high transmission community: antibody responses and their impact on current and future infection intensity. **Parasite Immunology**, v. 27, p. 89-96, 2005.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00753.x>

KNECHT, D.; JANKOWSKA, A.; ZALESNY, G. The impact of gastrointestinal parasites infection on slaughter efficiency in pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 291-297, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.006>

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.3, p.163-182, 2012.

<https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101137>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assemblage of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

<https://doi.org/10.1038/227680a0>

LEI, J. H.; GUAN, F.; XU, H.; CHEN, L.; SU, B. T.; ZHOU, Y.; WANG, T.; LI, Y. L.; LIU, W. Q. Application of an immunomagnetic bead ELISA based on IgY for detection of circulating antigen in urine of mice infected with *Schistosoma japonicum*. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 196-202, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.017>

LELES, D.; GARDNER, S. L.; REINHARD, K.; ÑIGUEZ, A.; ARAUJO, A. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasites & Vectors**, v. 5, p.1-7, 2012.

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-42>

LI, Q. Y.; ZHAO, D. H.; QU, H. Y.; ZHOU, C. N. Life-threatening complications of ascariasis in trauma patients: a review of the literature. **World Journal of Emergency Medicine**, v. 5, p.165-170, 2014.

<https://doi.org/10.5847/wjem.j.issn.1920-8642.2014.03.001>

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n.1, p.265-275, 1951.

MANHANI, M. N.; RIBEIRO, V. S.; CARDOSO, R.; UEIRA-VIEIRA, C.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 322-329, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01283.x>

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Clearance de imunocomplexos: papel do complemento e dos polimorfonucleares neutrófilos. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.30, n.2, p.234-242, 1997.

<https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v30i2p234-242>

MCSHARRY, C.; XIA, Y.; HOLLAND, C. V.; KENNEDY, M. Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with IgE antibody to ABA-1 allergen and inflammation. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 484-489, 1999.

MINEO, J. R. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área Biomédica: do planejamento a publicação**. 1ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2009. p. 81-111.

MOLLER, M.; GRAVENOR, M. B.; ROBERTS, S. E.; SUN, D.; GAO, P.; HOPKIN, J. M. Genetic haplotypes of Th-2 immune signalling link allergy to enhanced protection to parasitic worms. **Human Molecular Genetics**, v. 16, p. 1828-1836, 2007.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddm131>

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.1, p.507-624, 1948.

MÜLLER, S.; SCHUBERT, A.; ZAJAC, J.; DYCK, T.; OELKRUG, C. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. **Nutrition Journal**, v. 14, p. 109-116, 2015.
<https://doi.org/10.1186/s12937-015-0067-3>

MUNHOZ, L.; VARGAS, G.; FISCHER, G.; LIMA, M.; ESTEVES, P.; HÜBNER, S. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v. 44, p. 153-160, 2014.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000100025>

National Center for Biotechnology Information – NCBI, 2018. Taxonomy browser: *Ascaris lumbricoides*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6252>.
 Acessado em 03 de julho de 2018.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 13.ed, São Paulo: Atheneu, 2016. 588p.

NIKOLAY, B.; BROOKER, S.; PULLAN, R. Sensitivity of diagnostic tests for human soil-transmitted helminth infections: a meta-analysis in the absence of a true gold standard. **International Journal for Parasitology**, v. 44, p. 765-774, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.05.009>

NOGUEIRA, D. S.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H.; BARBOSA, F. S.; RESENDE, N. M.; SILVA, C. C.; DE OLIVEIRA, L. M.; AMORIM, C. C. O.; OLIVEIRA, F. M. S.; MATTOS, M. S.; KRAEMER, L. R.; CALIARI, M. V.; GAZE, S.; BUENO, L. L.; RUSSO, R. C.; FUJIWARA, R. T. Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. e0004382, 2016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004382>

O’LORCAIN, P.; HOLLAND, C. V. The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. **Parasitology**, v. 121, p. 51-71, 2000.
<https://doi.org/10.1017/S0031182000006442>

PARIJA, S.; CHIDAMBARAM, M.; MANDAL, J. Epidemiology and clinical features of soil-transmitted helminths. **Tropical Parasitology**, v. 7, p. 81-85, 2017.
https://doi.org/10.4103/tp.TP_27_17

PELLON, A. B.; TEIXEIRA, I. Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil. Ministério da Educação e Saúde, Departamento Nacional de Saúde, Divisão de Organização Sanitária. In: **Oitavo Congresso Brasileiro de Higiene**. Rio de Janeiro, 1950.

PETERS, W. Medical aspects-comments and discussion II. **Symposia of the British Society for Parasitology**, v. 16, p.25-40, 1978.

PULLAN, R. L.; BROOKER, S. J. The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 81-95, 2012.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-81>

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., p. 585-597, 2011.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes – modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p.5-8, 1954.

SALEMI, S.; MARKOVIC, M.; MARTINI, G.; D'AMELIO, R. The expanding role of therapeutic antibodies. **International Reviews of Immunology**, v. 34, p. 202-264, 2015.
<https://doi.org/10.3109/08830185.2013.863304>

SCHÄFER, T.; MEYER, T.; RING, J.; WICHMANN, H. E.; HEINRICH, J. Worm infestation and the negative association with eczema (atopic/nonatopic) and allergic sensitization. **Allergy**, v. 60, p. 1014-1020, 2005.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00801.x>

SCHWARZKOPF, C.; STAAK, C.; BEHN, I.; ERHARD, M. Immunisation. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chickens egg yolk antibodies, production and applications – IgY-Technology**. Springer-Verlag: Berlin, p. 255, 2001.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9_3

SCOTT, M. E. *Ascaris lumbricoides*: a review of its epidemiology and relationship to other infections. **Annales Nestlé**, v. 66, p.7-22, 2008.
<https://doi.org/10.1159/000151322>

SHAH, J.; SHAHIDULLAH, A. *Ascaris lumbricoides*: a startling Discovery during screening colonoscopy. **Case Reports in Gastroenterology**, v. 12, p. 224-229, 2018.
<https://doi.org/10.1159/000489486>

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K.; SUZUKI, T. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 763-772, 1994.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08122.x>

SILVA, A. V. M.; MASSARA, C. L. *Ascaris lumbricoides*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L. de.; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia Humana**, 13 ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2016. p. 295-301.

SILVA, J. C.; FURTADO, L. F. V.; FERRO, T. C.; BEZERRA, K. C.; BORGES, E. P.; MELO, A. C. F. L. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* e seus aspectos epidemiológicos em crianças do estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p.100-102, 2011.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000100022>

SOBH, A.; BONILLA, F. A. Vaccination in primary immunodeficiency disorders. **The Journal of Allergy and Immunology**, v. 4, p.1066-1075, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jaip.2016.09.012>

SUGITAKONOSHI, Y.; SHIBATA, K.; YUN, S. S.; HARAKUDO, Y.; YAMAGUSHI, K.; KUMAGAI, S. Immune functions of immunoglobulin Y isolatet from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, p. 886-888, 1996.
<https://doi.org/10.1271/bbb.60.886>

TAKATA, I. Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. **The Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v. 23, p.151-159, 1951.

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 131, p. 569-574, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00508-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00508-6)

VALENTINE, C. C.; HOFFNER, R. J.; HENDERSON, S. O. Three common presentations of ascariasis infection in na urban emergency department. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 20, p.135-139, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0736-4679\(00\)00300-0](https://doi.org/10.1016/S0736-4679(00)00300-0)

VILIBIC-CAVLEK, T.; BARBIC, L.; STEVANOVIC, V.; PETROVIC, G.; MLINARIC-GALINOVIC, G. IgG avidity: an important serologic marker for the diagnosis of tick-borne encephalitis virus infection. **Polish Journal of Microbiology**, v. 65, p. 119-121, 2016.
<https://doi.org/10.5604/17331331.1197285>

VLAMINCK, J.; LEVECKE, B.; VERCROYSSSE, J.; GELDHOF, P. Advances in the diagnosis of *Ascaris suum* in pigs and their possible applications in humans. **Parasitology**, v. 141, p. 1904-1911, 2014.
<https://doi.org/10.1017/S0031182014000328>

VLAS, S. J.; STOLK, W. A.; RUTTE, E. A.; HONTELEZ, J. A. C.; BAKKER, R.; BLOK, D. J.; CAI, R.; HOUWELING, T. A. J.; KULIK, M. C.; LENK, E. J.; LUYENDIJK, M.; MATHIJSSE, S. M.; REDEKOP, W. K.; WAGENAAR, I.; JACOBSON, J.; NAGELKERKE, N. J. D.; RICHARDUS, J. H. Concerted efforts to control or eliminate neglected tropical diseases: how much health will be gained? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. e0004386, 2016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004386>

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, p. 392-398, 1995.
[https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5)

WERKMAN, M.; WRIGHT, J. E.; TRUSCOTT, J. E.; EASTON, A. V.; OLIVEIRA, R. G.; TOOR, J.; OWE, A.; ÁSBJÖRNSDÓTTIR, K. H.; MEANS, A. R.; FARRELL, S. H.; WALSON, J. L.; ANDERSON, R. M. Testing for soil-transmitted helminth transmission elimination: Analysing the impact of the sensitivity of different diagnostic tools. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, p. e0006114, 2018.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006114>

YOSHIDA, A.; KIKUCHI, T.; NAKAGAKI, S.; MARUYAMA, H. Optimal ELISA antigen for the diagnosis of *Ascaris suum* infection in humans. **Parasitology Research**, v. 115, p. 4701-4707, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s00436-016-5239-3>

YOSHIHARAM S.; OYA, T.; FURUYA, T.; GOTO, N. Use of body fluid of adult female *Ascaris suum* as an antigen in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of swine ascariasis. **Journal of Helminthology**, v. 67, p. 279-286, 1993.
<https://doi.org/10.1017/S0022149X00013274>

ZHANG, X.; CALVERT, R. A.; SUTTON, B. J.; DORÉ, K. A. IgY: a key isotype in antibody evolution. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 92, p. 2144-2156, 2017.
<https://doi.org/10.1111/brv.12325>