



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



## TRABALHO DE TESE

RAPHAEL CHAGAS SILVA

Toxocaríase: soroprevalência, fatores de risco  
e avanços no imunodiagnóstico com proteínas  
quiméricas recombinantes

SALVADOR – BAHIA

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**RAPHAEL CHAGAS SILVA**

**Toxocaríase: soroprevalência, fatores de risco e avanços no imunodiagnóstico com proteínas quiméricas recombinantes**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Carina da Silva Pinheiro**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Natália G. de Moraes**

**SALVADOR- BAHIA**

**2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA-SIBI, pela Bibliotecária Maria de Fátima Martinelli CRB5/551, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586 Silva, Raphael Chagas

Toxocaríase: soroprevalência, fatores de risco e avanços no imunodiagnóstico com proteínas quiméricas recombinantes/Raphael Chagas Silva. – Salvador, 2024.

130 f.: il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carina da Silva Pinheiro; Coorientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Natália Gomes de Moraes.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2024.

Inclui referências.

1. Anticorpos. 2. Proteínas recombinantes. 3. Soroprevalência. 4. Toxocara spp.  
I. Pinheiro, Carina da Silva. II. Moraes, Natália Gomes de. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616-097



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

### TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

"Toxocaríase: Soroprevalência, fatores de risco e avanços no imunodiagnóstico com proteínas quiméricas recombinantes"

Elaborada por:

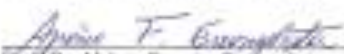
**RAPHAEL CHAGAS SILVA**


Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia como requisito parcial à obtenção do título de **DOCTOR**.

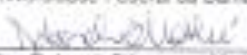
Salvador, Bahia, 23 de maio de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

  
Prof. Dra. Carina da Silva Pinheiro (Orientadora)  
ICS-Universidade Federal da Bahia

  
Prof. Dr. Abáris Ferreira Evangelista  
FIOCRUZ-BA

  
Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Pereira  
ICS - Universidade Federal da Bahia

  
Prof. Dra. Deborah Bitencourt Motta Freije  
FIOCRUZ-BA

  
Prof. Dra. Silvana Beutinger Marchion  
ICS-Universidade Federal da Bahia

Dedico a minha mãe Rita, a meu filho Hariel Henrique e a minha avó Ana. Eu amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe Rita Cleide que sempre compreendeu minhas escolhas, mesmo que elas nos distanciassem fisicamente, você é minha vida! Agradeço a meu filho Hariel que sempre foi o impulso por trás de tudo que eu consegui conquistar até hoje. Agradeço amorosamente a Guilherme de Oliveira por todo amor, apoio, incentivo e companheirismo ao longo de toda essa jornada. Te amo!

Agradeço a Universidade Federal da Bahia por emprestar a casa para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido. Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro investido nesse projeto e em mim. Obrigado a minha co-orientadora Dra. Natália de Moraes. Obrigado a Dr. Gúbio, por todo apoio técnico-científico nesse percurso.

Obrigado a Dra. Neuza Alcântara por acreditar em mim, por confiar e me ensinar a crescer profissionalmente, você é exatamente tudo aquilo que eu desejei que fosse. Obrigada de todo coração.

Um obrigado especial a minha orientadora Dra. Carina da Silva Pinheiro por sempre ter sido luz nos momentos mais difíceis durante essa jornada. Esse trabalho não teria sido possível sem sua orientação, paciência, ensinamentos e carinho. Me lembro de dizer que tinha certeza que você contribuiria muito para esse projeto, por tudo que vejo em você profissionalmente. Você é incrível e eu só tenho a agradecer por esses anos de orientação.

Obrigado a todos os colegas/amigos envolvidos nesse processo, mesmo que indiretamente, em especial aos meus amigos Anne, Diana, Deise, Iuri, Heron, Siza, Matheus, Jarele, Vitor Lima, Cauzy, Magno, Vitor Alves, Fabian, Ciely e Elbes pelos momentos de descontração e alegria, eles foram muito importantes para aliviar os momentos tensos deste processo.

Por fim, obrigado aos irmãos que aqui eu fiz: Márcio Fernandes, Leonardo, Márcia Barbosa, Carolina Orrico e Edu Silva vocês me receberam de braços abertos e me ensinaram muito nessa estrada, muito obrigada.

## RESUMO

**Introdução:** A toxocaríase humana está entre as doenças helmínticas mais negligenciadas no mundo. As infecções por *Toxocara* spp., estão associadas à fatores de risco aos quais os indivíduos estão expostos. O diagnóstico desta infecção é realizado através de ELISA usando antígenos excretados-secretados do *Toxocara* spp. como padrão-ouro. No entanto, esse método enfrenta desafios como reatividade cruzada e variação nos parâmetros de precisão.

**Objetivos:** Determinar a soroprevalência da toxocaríase em um estudo prospectivo (2005-2013), avaliar os fatores de risco envolvidos e desenvolver proteínas quiméricas recombinantes para uso no imunodiagnóstico.

**Metodologia:** Soros de 926 participantes do estudo epidemiológico SCAALA (2005 e 2013) foram imunodiagnosticados por ELISA indireto, e foram avaliadas as associações da infecção com aspectos clínicos e sociodemográficos. Proteínas quiméricas (rSHORT e rFULL) baseadas em epítomos de células B foram expressas e utilizadas no imunodiagnóstico de toxocaríase em 232 soros provenientes do Programa de Controle de Asma e Rinite de Salvador.

**Resultados:** A prevalência de anticorpos IgG anti-*Toxocara* foi de 48% em 2005 e 53% em 2013, com 25% de novos casos em 2013. O aumento da idade e exposição a animais de estimação foram fatores de risco, enquanto maior escolaridade materna e residir em ruas pavimentadas foram fatores protetores para essa infecção. Indivíduos positivos apresentaram correlação negativa com a reatividade ao Skin Prink Test, enquanto níveis elevados de IL-10 e eosinófilos em ambos os anos foram positivamente associados.

A proteína rSHORT apresentou sensibilidade de 98,6% e 99,3%, e especificidade de 94,4% e 97,8% em soros adsorvidos e não adsorvidos, respectivamente. A proteína rFULL apresentou sensibilidades de 93,7% e 89,4%, e especificidade de 86,7% e 81,1% nos mesmos tipos de soros.

**Conclusão:** As rotas de infecção por *Toxocara* spp. em nossa população de estudo estavam principalmente associados ao terceiro grupo etário ( $\geq 8$  anos) e à presença de gatos ou cães em casa. Aumentar o nível de educação materna em conjunto com melhores condições de habitação também são um fator importante para mitigar a

infecção por *Toxocara* spp. Tanto no Dot Blot quanto no ELISA indireto a proteína rSHORT utilizada como antígeno no imunodiagnóstico da toxocaríase apresentou resultados superiores e mais confiáveis em comparação a proteína rFULL. Comparativamente com as moléculas TES-26 e CTL-4, a proteína rSHORT demonstrou maior potencial para ser utilizada como um antígeno alternativo no imunodiagnóstico da toxocaríase.

**Palavras-chave:** Anticorpos, Proteínas recombinantes, Soroprevalência, *Toxocara* spp.



## ABSTRACT

**Introduction:** Human toxocariasis is among the most neglected helminthic diseases worldwide. Infections by *Toxocara* spp. are associated with risk factors to which individuals are exposed. Diagnosis of the infection is typically performed through ELISA using excretory-secretory antigens of *Toxocara* spp. as the gold standard; however, cross-reactivity and variation in precision parameters are some disadvantages of this test.

**Objective:** This study aimed to determine the seroprevalence of toxocariasis in a prospective study (2005-2013); assess the associated risk factors; and produce recombinant chimeric proteins for use in immunodiagnosics. Sera from 926 participants in the SCAALA epidemiological follow-up (2005 and 2013) were immunodiagnosed using indirect ELISA, and associations of the infection with clinical and sociodemographic aspects of the individuals were evaluated. Chimeric proteins (rSHORT and rFULL), based on B-cell epitopes, were expressed and used in the immunodiagnosis of toxocariasis in 232 sera from the Salvador Asthma and Rhinitis Control Program.

**Results:** The prevalence of anti-*Toxocara* IgG antibodies was 48% in 2005 and 53% in 2013, with 25% of new cases occurring in 2013. Increasing age and exposure to pets were consistent risk factors, while higher maternal education and living on paved streets were protective factors. Positive individuals showed a negative correlation with Skin Prick Test reactivity, while elevated levels of IL-10 and eosinophils in both years were positively associated. The rSHORT protein showed sensitivities of 98.6% and 99.3% in adsorbed and non-adsorbed sera, respectively, while in specificities it reached 94.4% and 97.8%. The rFULL protein showed sensitivities of 93.7% and 89.4%, respectively, and specificities of 86.7% and 81.1%.

**Conclusion:** The infection patterns of *Toxocara* spp. in our study population were primarily linked to the third age group ( $\geq 8$  years old) and the presence of cats or dogs at home. Elevating maternal education levels alongside improved housing conditions also emerged as significant factors in mitigating *Toxocara* spp. infection. Both in Dot Blot and indirect ELISA, the rSHORT protein used as an antigen in the immunodiagnosis of toxocariasis showed superior and more results that are reliable compared to the rFULL protein. Comparatively to TES-26 and CTL-4 molecules, the rSHORT protein

demonstrated greater potential to be used as an alternative antigen in the immunodiagnosis of toxocariasis.

**Key words:** Antibodies, Recombinant proteins, Seroprevalence, *Toxocara* spp.

## LISTA DE SIGLAS

CI – “Intervalo de confiança”

ELISA – “Ensaio de absorção imunoenzimático”

GINA – “Iniciativa Global Contra a Asma”

GTE<sub>x</sub> – Projeto de expressão gênica genótipo- tecido

HIS – “Histidina”

IgE – “Imunoglobulina E”

IgG – “Imunoglobulina G”

IgG<sub>4</sub> – “Subclasse de Imunoglobulina G<sub>4</sub>”

IL – “Interleucina”

IFN – “Interferon”

IPTG – “Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo”

LMV – “Síndrome da larva migrans visceral”

LMO – “Síndrome da larva migrans ocular”

NCBI – “Centro Nacional para Informação Biotecnológica”

ProAR – “Programa de Controle da Asma e da Rinite Alérgica na Bahia”

rCTL<sub>4</sub> – “Antígeno recombinante do CTL<sub>4</sub>”

rTES 26 – “Antígeno recombinante do TES 26”

SCAALA – “Social Changes in Asthma and Allergy in Latin America”

SDS-PAGE – “Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS”

SPT – “Teste cutâneo”

TES – “Antígeno excretado-secretado da larva de *Toxocara* spp.”

TGF- β – “Fator de crescimento transformador beta”

Th<sub>2</sub> – “T helper type 2”

WB – “Western-blotting”

## LISTA DE FIGURAS

**MANUSCRITO 1:** "A Roadmap to toxocariasis infection control: A comprehensive study on its impact, seroprevalence, and allergic implications in Latin America"

**Figure 1.** Chronological order representation of results disposal through the article according to the number of individuals in each analysis..... 38

**Figure 2.** Comparison of absolute eosinophil counts and spontaneous IL-10 concentrations between individuals positive and negative for IgG anti-*Toxocara* spp. in both years. .... 48

**MANUSCRITO 2:** "Production and evaluation of new chimeric antigens to *Toxocara* spp. immunodiagnostic optimization"

**Figure 1.** Design, characterization and validation of chimeric recombinant proteins (rSHORT and rFULL). .... 70

**Figure 2.** ROC curves analysis for rSHORT and rFULL chimeric antigens..... 73

**Figure 3.** Comparison of reactivities of IgG and IgG4 antibodies against the mix of rTES26 and rCTL-4-ELISA and ELISA with rSHORT and rFULL chimeric antigens using absorbed e non-absorbed sera. .... 75

**Figure 4.** Supplamantary Material. Dot Blot to assess the recombinant proteins reactivity in positives and negatives tested sera by indirect ELISA. .... 80

**PATENTE:** “Melhoramento do método de imunodiagnóstico da toxocaríase humana utilizando proteínas recombinantes quiméricas denominadas rSHORT e rFULL, baseadas em epítopos de células B das moléculas parentais TES-26 e CTL-4”

<b>FIGURA 1</b> Sequências codificadoras das proteínas quiméricas .....	110
<b>FIGURA 2</b> Designe 3D da estrutura terciária das proteínas.....	110
<b>FIGURA 3</b> Validação da expressão; Gel SDS e Western Blotting.....	111
<b>FIGURA 4</b> Análise da reatividade das proteínas quiméricas por Dot Blot.....	111
<b>FIGURA 5</b> Reatividade das proteínas usando IgG e IgG4 como anticorpos em soros adsorvidos e não adsorvidos.....	112
<b>FIGURA 6</b> Gráficos das Curvas Roc para análise de sensibilidade e especificidade antigênica.....	113

## LISTA DE TABELAS

**MANUSCRITO 1:** "A Roadmap to toxocariasis infection control: A comprehensive study on its impact, seroprevalence, and allergic implications in Latin America"

**Table 1.** Positivity to IgG anti-*Toxocara* spp. in 926 sera from the SCAALA population..... 39

**Table 2.** Frequencies of sociodemographic variables to the study of risk factors for *Toxocara* spp. infection collected from SCAALA database ..... 40

**Table 3.** Analysis of risk factors linked to IgG anti-*Toxocara* spp. seropositivity in a cohort of 926 Individuals in 2005 and 2013..... 42

**Table 4.** Analysis of risk factors linked to IgG anti-*Toxocara* spp. seropositivity in 494 individuals testing positive in both years (2005 and 2013) ..... 44

**Table 5.** Association between seropositivity for IgG anti-*Toxocara* spp. and specific IgE (sIgE), as well as Skin Prick Test for at least one common aeroallergen in a study cohort of 490 individuals examined in 2005 and 2013 ..... 46

**Table 6.** Association between seropositivity for IgG anti-*Toxocara* spp. and eosinophil levels at 4%, 10%, and eosinophilia ( $\geq 500\text{mm}^3$ ) in a study cohort of 435 individuals investigated in 2005 and 2013..... 47

**MANUNSCRITO 2:** "Production and evaluation of new chimeric antigens to *Toxocara* spp. immunodiagnostic optimization"

**Table 1.** Validation parameters for the ELISAs designed to detect total IgG and IgG4 antibodies against *T. canis*, using recombinant antigens ..... 72

**PATENTE:** "Melhoramento do método de imunodiagnóstico da toxocaríase humana utilizando proteínas recombinantes quiméricas denominadas rSHORT e rFULL, baseadas em epítomos de células B das moléculas parentais TES-26 e CTL-4"

**TABELA 1** Parâmetros de validação dos ELISAs utilizando antígenos recombinantes..... 114

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Etiologia da toxocaríase. ....	21
2.2 Epidemiologia da doença e fatores de riscos. ....	22
2.3 Fisiopatologia da infecção por <i>Toxocara</i> spp. ....	24
2.4. Infecção por <i>Toxocara</i> spp., e associação com alergias. ....	25
2.5 Diagnóstico da toxocaríase. ....	27
3. JUSTIFICATIVA .....	29
4. OBJETIVO .....	29
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
5. CAPÍTULO 1 – Manuscrito submetido no periódico: Allergies- MDPI .....	32
Introduction .....	33
Materials and Methods .....	34
Study population.....	34
Obtaining antigens from the excretory-secretory of <i>T. canis</i> larvae (TES) .....	35
Sera absorption with <i>Ascaris lumbricoides</i> antigen .....	35
Eosinophils counting, cytokine quantification Skin Prink Tests (SPTs) .....	35



IgG antibody to <i>Toxocara</i> spp. detection from ELISA.....	36
Data analysis.....	37
Results .....	37
Seroprevalence of IgG anti- <i>Toxocara</i> spp.....	38
Predictors of <i>Toxocara</i> spp. infection based on sociodemographic factors .....	39
Comparison of risk and protective factors for <i>Toxocara</i> spp. infection in individuals with persistent IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. positivity over time (IgG positivity in 2005 and 2013).....	43
Association analysis of <i>Toxocara</i> spp. infection, atopic markers, and eosinophils levels in the studied population .....	45
Effects of <i>Toxocara</i> spp. infection on immunological features.....	48
Discussion.....	49
Conclusion .....	53
References.....	55
6. CAPÍTULO 2 – Manuscrito a ser submetido no periódico: Acta Tropica Journal .....	61
1- Introduction .....	63
2 - Material and methods.....	65
2.1- Human sera samples .....	65
2.2- Construction of chimeric genes of <i>T. canis</i> rSHORT and rFULL .....	65

2.3- Transformation, heterologous expression and purification method of <i>T. canis</i> chimeric proteins.....	66
2.4- Dot Blot assay using <i>T. canis</i> chimeric recombinant proteins rSHORT and rFULL as antigens to reactivity assessment.....	67
2.5- Sera absorption with <i>Ascaris lumbricoides</i> antigen .....	67
2.6- IgG and IgG4 ELISA using purified mix of rTES-26/rCTL-4, rSHORT and rFULL chimeric antigens .....	68
3- Results .....	69
3.1. Design, expression and purification of <i>T. canis</i> rSHORT and rFULL chimeric recombinant antigens.....	69
3.2. Dot Blot assay and indirect ELISA using <i>T. canis</i> mix (rTES26/rCTL-4 proteins) and rSHORT and rFULL chimeras as antigens to reactivity assessment....	71
3.3. Comparison of reactivity among recombinants proteins and the mix of proteins by indirect ELISA with the best profile for toxocariasis immunodiagnostic ...	73
4 - Discussion.....	76
S1-Supplementary Material.....	80
References.....	81
7. CAPÍTULO 3 – PATENTE A SER SUBMETIDA AO NIT/UFBA.....	86
RESUMO .....	87
RELATÓRIO DESCRITIVO.....	88
REIVINDICAÇÕES.....	106

FIGURAS .....	110
TABELA .....	114
REFERÊNCIAS.....	115
8. CONCLUSÃO .....	119
9. REFERÊNCIAS.....	121

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Toxocara* spp., é constituído por 21 espécies de nematódeos gastrointestinais responsáveis pelo desenvolvimento da toxocaríase em animais, sejam eles domésticos ou selvagens (MAZUR-MELEWSKA et al. 2012). As espécies *T. canis* e *T. cati* infectam cães e gatos, os quais liberam seus ovos no ambiente através das fezes e que quando ingeridos acidentalmente pelos humanos levam ao desenvolvimento da toxocaríase humana (STRUBE et al. 2013). Embora tenham sido encontrados mundialmente, a incidência da toxocaríase é relatada principalmente em regiões tropicais com baixos níveis socioeconômicos (AHN et al. 2014). As infecções por *Toxocara canis* têm sido relatadas mais frequentemente do que as por *Toxocara cati* e estas infecções estão diretamente associadas aos fatores de risco aos quais os indivíduos estão expostos, como por exemplo, presença de cães e gatos no ambiente, contato direto com areia infectada, consumo de alimentos contendo ovos embrionados destes helmintos entre outras condições que facilitam a ingestão dos ovos destes helmintos pelo ser humano (MACPHERSON, 2013). Sabe-se por exemplo, que esses fatores associados a infecção mudam conforme o tempo, condição socioeconômica, aumento da escolaridade e hábitos de higiene dos indivíduos, requerindo deste modo, um acompanhamento sociodemográfico desta população para identificar quais são os fatores associados com esta infecção ao longo dos anos e traçar métodos preventivos visando a diminuição desta infecção (GUANGXU et al. 2018).

Embora a infecção seja considerada quando há de fato ingestão de ovos do helminto, ele embrionado ou não, a toxocaríase humana é causada pela migração da larva de *Toxocara* spp., no hospedeiro paratênico e este movimento migratório pelos órgãos é conhecido como síndrome da larva migrans visceral (LMV), porém existem larvas que migram diretamente para o globo ocular, ocasionando a síndrome da larva migrans ocular (LMO) (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013). Dependendo da localização atual das larvas, a toxocaríase pode ser dividida em toxocaríase clássica, assintomática, oculta e compartimentalizada (ocular e neurológica) (PAWLOWSKI, 2001). Os sintomas da infecção vão desde febre alta, palidez, anemia,

hepatoesplenomegalia, entre outros; e associações com níveis elevados de eosinófilos e imunoglobulina E (ALCANTARA-NEVES et al. 2014), embora a maioria dos casos de toxocaríase seja assintomática (WALSH, 2011).

As larvas infectantes de *Toxocara* spp., modulam a resposta imunológica do hospedeiro para um perfil Th2, tanto das células da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa, culminando na produção de citocinas pro-inflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-13), assim, há um aumento dos níveis de eosinófilos e um aumento da produção de anticorpos IgE pelas células plasmocitóides (CARVALHO & ROCHA, 2011). Como estratégia de burlar o sistema imune, esses nematóides desenvolveram mecanismos de defesa contra a resposta imunológica induzindo a produção de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  pelas células T regulatórias, ocasionando a não eliminação destes helmintos do organismo (PLATTS-MILLS et al. 2000). Deste modo, a infecção pelos *Toxocara* spp. está associada às respostas imunológicas que contribuem para sintomatologia da alergia e conseqüentemente da asma alérgica, contribuindo para a diminuição da capacidade respiratória, principalmente em indivíduos que já são asmáticos (BUIJS et al. 1997).

Além disto, a resposta imunológica desencadeada pela infecção por *Toxocara* spp., não está exclusivamente associada a uma resposta do perfil Th2, alguns estudos demonstraram que esta infecção pode gerar uma resposta imunológica de um perfil Th1, produzindo IFN- $\gamma$  e moléculas que causam efeitos deletérios nos órgãos, mais especificamente nos vasos do pulmão dificultando o tratamento de indivíduos acometidos com desordens respiratórias (ALVAREZ-GUTIÉRREZ et al. 2010; RODOLPHO et al. 2018; FICA et al. 2021).

O diagnóstico de toxocaríase é feita através da combinação do quadro clínico e de métodos sorológicos, como por exemplo, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), usando anticorpos específicos contra antígenos produzidos por *Toxocara* spp., principalmente o anticorpo IgG (imunoglobulina G) que é produzido pelo reconhecimento de proteínas presentes no antígeno excretado/secretado do

nematóide (TES) (AMARAL et al. 2010; SANDRA et al. 2021), outro anticorpo utilizado no diagnóstico de infecção por *Toxocara spp.*, é o IgG4 (imunoglobulina G, subclasse 4) que é usado também no diagnóstico de outros parasitoides. Porém, o uso de anticorpos IgG4 para diagnóstico de toxocaríase vem sendo discutido em alguns estudos com relação a sua capacidade de diagnosticar a infecção em suas fases, por exemplo, alguns estudos demonstraram que a IgG4 é capaz de fornecer um diagnóstico mais efetivo se a infecção estiver em sua fase tardia ou crônica, enquanto outros afirmam que o diagnóstico feito utilizando IgG4 não permite um diagnóstico preciso e que por muitas vezes é necessária a utilização de outro diagnóstico utilizando IgG para a confirmação da infecção (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013; LACHAUD et al. 2009; NOORDIN et al. 2005).

A pesquisa de anticorpos utilizando antígenos brutos ou parcialmente purificados de *T. canis* tem ocasionado problemas no diagnóstico da infecção devido à baixa concentração de antígenos específicos, reatividade cruzada entre anticorpos IgG produzidos pelo antígeno de *T. canis* e anticorpos IgG produzidos por antígenos de outros parasitos, alto custo e tempo de produção deste antígeno, por exemplo (CARMENA et al. 2006). Essa reatividade cruzada afeta a sensibilidade e especificidade do teste, prejudicando o diagnóstico correto da infecção e aumentando a necessidade da produção de novos antígenos que sejam capazes de diagnosticar a toxocaríase de forma precisa (GRUNTMEIR et al. 2021).

Com o avanço da tecnologia e o advento da biologia molecular, tornou-se possível a produção de moléculas recombinantes a partir de proteínas presentes no excretado-secretado das larvas do *Toxocara spp.*, para o desenvolvimento e/ou melhoramento das técnicas de imunoenaios de diagnóstico, como por exemplo as moléculas recombinantes TES-26 e CTL-4. Enquanto a TES-26 é uma proteína homóloga a fostatidiletanolamina, um glicofosfolípídeo presente no produto excretado-secretado pela larva do *Toxocara spp.* (GEMS et al. 1995), a CTL-4 é uma lectina presente na superfície da larva do *Toxocara spp.*, e que é liberada constantemente pelo nematódeo (LOUKAS et al. 2000). Ambas as proteínas são capazes de estimular

respostas imunológicas que culminam na produção de anticorpos direcionados a estes antígenos específicos melhorando a precisão do imunodiagnóstico de toxocaríase. Um exemplo desta melhoria, foi observado por Da Silva e colaboradores (2022) que utilizaram a combinação destas duas moléculas recombinantes e conseguiram aumentar a sensibilidade e especificidade do teste usando a ligação antígeno-anticorpo em 100% para ambos os parâmetros (Da SILVA et al. 2022). Apesar desta melhoria no método de diagnóstico da toxocaríase, a produção de proteínas recombinantes ainda é dispendiosa, requer técnicas específicas e mão de obra qualificada para sua produção.

Com base nestes pressupostos, a avaliação de fatores de riscos associados a infecção por este nematóide ao longo dos anos e o estudo de novas moléculas recombinantes do produto antigênico excretado/secretado de *Toxocara* spp., assim como a sua utilização para melhoria ou otimização do imunodiagnóstico são de suma importância para um controle preventivo da infecção e para fornecer um diagnóstico mais rápido, mais preciso da doença e de forma mais barata.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Etiologia da toxocaríase**

A toxocaríase humana é uma parasitose causada pela infecção do hospedeiro por nematóides do gênero *Toxocara* spp., conhecidos como *T. canis* e *T. cati*, sendo que a infecção por *T. canis* é mais ocorrente (ROMERO-MÚÑES et al. 2013). As espécies do gênero *Toxocara* spp., são pertencentes à ordem Ascaridida e da família Toxocaridae. Os hospedeiros definitivos mais comuns são os cães e os gatos, sendo o homem um hospedeiro acidental, denominado de hospedeiro paratênico (COOPER, 2008). Após a infecção de cães e gatos pela deglutição dos ovos desses parasitos, eles completam o seu ciclo de vida no tubo digestivo, compreendendo as fases: amadurecimento e eclosão de ovos, desenvolvimento das formas larvais até a fase adulta e fase de reprodução (ALMEIDA et al. 2007). A reprodução acontece no intestino destes animais e conseqüentemente os ovos que são produzidos pelas fêmeas são

externalizados por meio das fezes dos hospedeiros definitivos (NOUROLLAHI FARD et al. 2024)

A fêmea do *Toxocara* spp., pode produzir até 200.000 ovos em apenas um dia, que por sua vez, são eliminados nas fezes de cães e gatos infectados (KOCHLE et al. 2022). No solo, após algumas semanas de incubação os ovos embrionados tornam-se infectantes e podem se manter ativos no solo por um longo período de tempo (GAPUANO & ROCHA, 2005). Quando os ovos embrionados deste nematóide são deglutidos pelo homem acidentalmente, as larvas em terceiro estágio são liberadas no intestino do hospedeiro paratênico e posteriormente, penetram a mucosa intestinal e podendo atingir os vasos sanguíneos e linfáticos, sendo distribuído assim para qualquer órgão do corpo. Porém, estas larvas são capazes de realizar a migração somática sem necessariamente serem transportadas por vasos sanguíneos ou linfáticos (WU et al. 2024). No homem, tal como em outros hospedeiros acidentais, este parasita não consegue atingir a sua forma adulta, permanecendo como larvas migrando entre os órgãos destes indivíduos modulando as respostas imunológicas, evadindo o sistema imunológico e ocasionando respostas deletérias no hospedeiro (MAGNAVAL et al. 2001; SCHWARTZ et al. 2021).

## **2.2 Epidemiologia da doença e fatores de riscos**

A toxocaríase está entre as doenças parasitárias de maior incidência em países tropicais e subtropicais, onde as condições socioeconômicas e o controle de zoonose são baixos, contribuindo para a prevalência de infecções pelos parasitos (CAMPOS-FILHO et al. 2008). Alguns estudos desenvolvidos ao redor do mundo demonstraram que a prevalência da toxocaríase entre crianças são maiores quando comparados a adultos, provavelmente devido ao maior contato com áreas contaminadas pelos ovos deste nematóide e por terem um menor hábito de higiene (DESPOMMIER, 2006). É relatado também que a prevalência pode variar dentro de regiões do próprio país (CHIDUMAYO, 2020), por exemplo, em países ocidentais estima-se que entre 2 a 5% dos adultos que habitam zonas urbanas e 14.2 a 37% dos que residem em zonas rurais



tenham evidências sorológicas de contato com este parasito (MAGNAVAL et al. 2001). Em Bali, a soropositividade para anticorpos contra antígenos do *T. canis* chega a 63,2% (CHOMEL et al. 1993) e nos Estados Unidos foram registradas prevalências entre 4,6% a 7,3% (HOTEZ & WILKINS, 2009). No Brasil existem poucos trabalhos de prevalência de toxocaríase em adultos, provavelmente devido aos casos assintomáticos existentes, mas alguns estudos estimam que a prevalência da toxocaríase em adultos seja semelhante a encontrada em crianças (ANARUMA FILHO et al. 2003). Chieffi e colaboradores (2009) encontraram prevalências que variavam entre 3,72% e 40% nos estados de São Paulo, Pernambuco, Goiás, Acre, Minas Gerais, Espírito Santo e Mato Grosso do Sul. No Paraná em 2011, a prevalência encontrada foi de 32,2%, enquanto em 2015 foi de 25% (MARCHIORO et al. 2011a; MARCHIORO et al, 2015b). No Estado do Rio Grande do Sul em 2013 a prevalência encontrada foi de 50.6% (SCHOENARDIE et al. (2013) e em 2015 foi de 6.4% (SANTOS et al. (2015). Embora exista uma disparidade nas prevalências durante os anos e regiões onde os estudos citados acima aconteceram, na maioria dos casos de toxocaríase, o baixo nível socioeconômico, a contaminação do solo por ovos de *Toxocara* spp., e o contato constante com cachorros eram os principais fatores de risco para a infecção pelo parasito.

Na Bahia, em Salvador, o estudo realizado por Alcantara-Neves et al. (1989) encontrou na população, prevalência de infecções por *Toxocara* spp., valores equivalentes a 24,8%. Este trabalho demonstrou que a presença de cão, idade do cão, idade do hospedeiro paratênico e a contaminação ambiental são importantes fatores de risco para a infecção por *T. canis*. Em 2011, Dattoli e colaboradores encontraram avaliando a sorologia de 306 mulheres grávidas uma prevalência de 46.3%, enquanto Mendonça e colaboradores (2012), analisando soros de 1.445 crianças, moradoras de Salvador, Bahia, observaram uma prevalência de 47% de soropositividade para *Toxocara canis*. Silva e colaboradores (2016), estudando 791 crianças numa cidade próxima a Salvador, Bahia, encontraram prevalência de toxocaríase de 63.6% na população de estudo, o que é considerado uma prevalência alta. Isto mostra mais uma vez que estudos mais aprofundados acerca da epidemiologia da doença, rotas de

infecção e diagnósticos sorológicos precisam ser realizados na tentativa da erradicação do parasito e da doença.

Existe uma dificuldade na determinação de valores exatos da prevalência da infecção por este parasito devido à dificuldade no diagnóstico de anticorpos contra antígenos específicos destes helmintos, gerando na maioria dos casos um diagnóstico errado (DURANT, 2012; YUNUS et al. 2018). Este impasse na determinação da prevalência de infecção também está relacionado a elevada porcentagem dos casos assintomáticas (WALSH & HASEEB, 2012).

### **2.3 Fisiopatologia da infecção por *Toxocara* spp.**

O ser humano é um dos hospedeiros paratênicos do *Toxocara* spp., logo, o parasito permanece no corpo do hospedeiro e não consegue completar seu ciclo de vida (STRUBE et al. 2012). Desse modo, as larvas que atingem a corrente sanguínea e conseqüentemente algum órgão, dependendo da localização podem promover alterações necróticas e hemorrágicas (THOMPSON, 2013). Inicialmente, a presença das larvas no tecido dá início a fase inflamatória aguda em decorrência da resposta inflamatória que é dirigida contra os antígenos secretados ou excretados pelas larvas do *Toxocara* spp. (TES), esse antígeno é formado por um complexo de proteínas glicosiladas, além de uma fração de componentes alergênicos que então são reconhecidos por PAMPs (padrões moleculares associados a agentes patogênicos) presentes em células dendríticas, que por sua vez processará e apresentará estes antígenos através de moléculas MHC de classe II para células T *naives* (HEWITSON, GRAINGER e MAIZELS, 2009). Essa apresentação antigênica ocasiona um estímulo potente de resposta inflamatória do tipo alérgico induzindo uma resposta celular tipo T2, caracterizada principalmente pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13, ativação e migração de eosinófilos para o sítio de infecção, além da produção de moléculas de IgE e ativação de monócitos (PELLOUX & FAURE, 2004; SILVA et al. 2016).

Em alguns casos a larva migra rapidamente o que não permite o desenvolvimento de reações inflamatórias, mas elas permanecem ativas liberando seu

produto antigênico, dentre essas proteínas produzidas está uma protease capaz de manter um tipo de cápsula de colágeno que atua como um mecanismo de defesa contra reações imunológicas do hospedeiro, perpetuando a reação inflamatória e dando início a formação de granulomas (DESPOMMIER, 2006). Sendo assim, as manifestações clínicas da toxocaríase são consequência do dano tecidual causado pela migração da larva ou da resposta gerada pelo hospedeiro na tentativa de responder aos estímulos gerados pelos metabólitos liberados pelas larvas.

Clinicamente, a infecção por *Toxocara* spp., pode apresentar sinais e sintomas clássicos, dependendo do número de larvas e do local onde elas estão alojadas. A toxocaríase humana pode ser classificada em subclínica que pode ocorrer quando o indivíduo é infectado com um pequeno número de larvas e a resposta imunológica é capaz de eliminar o patógeno, geralmente é assintomática, síndrome da larva migrans visceral (LMV) causados pela migração larvar e pode desenvolver eosinofilia, habitualmente superior a 1.500 células por mm<sup>3</sup>, leucocitose, hepatomegalia e hipergamaglobulinemia, comprometimento neurológico, cutâneo e pulmonar onde os sintomas incluem tosse, sibilância e asma (SILVA et al. 2004) e, por fim, a forma ocular (LMO), onde há o comprometimento da acuidade visual, dor ocular, estrabismo e inflamações na região ocular (HANH et al. 2020).

#### **2.4. Infecção por *Toxocara* spp., e associação com alergias**

A infecção pelo nematóide *Toxocara* spp. está diretamente associada às respostas imunológicas que contribuem para o desenvolvimento da sintomatologia da alergia (JOGI et al. 2018). Estudos tem demonstrado que a soropositividade ao *T. canis* apresentou resultados significativos com o desenvolvimento da asma alérgica e aumento de IgE específica para aeroalérgenos (*Blomia tropicalis*) (BUIJS et al. 1997; SILVA et al. 2016); assim como alterações no fluxo respiratório (MARTIN et al., 2008). Mendonça e colaboradores (2012) observaram associações entre soropositividade para *T. canis* e o aumento de eosinófilos aos níveis 4% e 10% em pacientes asmáticos, além de um aumento do nível de IgE específicas para aeroalérgenos. Existe uma

associação entre o tempo de infecção por *T. canis* e a ativação da resposta imune, Pineli et al. (2007) observaram em modelo murino usando ovoalbumina que a infecção por *T. canis* está associada ao aumento da produção de citocinas IL-4 e eosinófilos nas vias aéreas na fase inicial da infecção, além disso, foi observado aumento da IgE no plasma e no lavado bronco-alveolar (BAL) durante todas as fases da infecção.

A indução de uma resposta inflamatória do tipo T2 não é a única ocasionada pela infecção por *T. canis*. Estudos tem mostrado que a infecção por *T. canis* pode levar a ativação de citocinas do perfil Th1, como por exemplo, IFN- $\gamma$  e moléculas como o óxido nítrico que tem efeitos deletérios no sistema vascular pulmonar (ALVAREZ-GUTIÉRREZ et al. 2010). A via de sinalização citoplasmática envolvida na produção de oxido nítrico após o estímulo com antígeno de *T. canis* foi estudada em macrófagos alveolares de ratos, mostrando que a fosfolipase C e A2 induzem a produção e liberação do óxido nítrico (SALVIANO et al. 2018).

A migração da larva de *T. canis* entre os tecidos causa lesões aos órgãos que culmina na liberação de IL-6, IFN gama, eotaxina e RANTES (Regulada por Ativação, Normal T Expressa e Secretada) que são mediadores de inflamação tendo a eotaxina como uma quimioatraente de eosinófilos e o RANTES como um indutor de respostas eosinofílicas (CHIA-KWUNG et al. 2013), mostrando que a infecção por *T. canis* modula as respostas imunes para um perfil inflamatório das vias aéreas.

Na tentativa de entender os mecanismos envolvidos na imunopatologia desta infecção bem como seus efeitos em patologias imunomediadas como a asma, modelos murinos tem sido amplamente utilizado com este propósito (PECINALI et al. 2005; PINELLI et al. 2013). Estes estudos vêm mostrando que infecção por *T. canis* resulta em inflamação pulmonar persistente, eosinofilia, aumento da produção de IgE, hiperreatividade das vias aéreas e produção de citocinas do tipo Th2 (CRISTINA et al. 2013). Todos esses mecanismos imunológicos induzidos pela infecção por *T. canis* podem estar ocasionando o desenvolvimento da sintomatologia da asma e quadros de alergia ou piorando o quadro clínico já existente (PINELLI et al. 2013).

## 2.5 Diagnóstico da toxocaríase

O diagnóstico da toxocaríase não é passível de ser feito exclusivamente com base no quadro clínico do paciente, uma vez que, muitos dos infectados são assintomáticos (MOREIRA et al. 2014), além disso, como o parasito não consegue chegar a fase adulta no hospedeiro paratênico, ele não consegue se reproduzir e liberar ovos com isso o exame parasitológico não é recomendado. Uma vez que a migração das larvas pode causar danos a vários órgãos, o espectro sintomatológico é ampliado o que pode ser confundido com sintomas de outras doenças. Alguns dos métodos utilizados para confirmação da infecção são: a tomografia computadorizada, a análise histopatológica e imuno-histoquímica com anticorpos policlonais, porém as desvantagens dessas técnicas é que além de ser um procedimento invasivo, cara e de difícil execução, existe uma dificuldade na identificação das larvas devido ao tamanho muito reduzido (FICA et al. 2021).

Outro método utilizado para o imunodiagnóstico da toxocaríase é a detecção do DNA das larvas do parasita em amostras de tecido ou fluidos corporais. Embora a técnica molecular baseada em PCR para a identificação da espécie usando marcadores genéticos ITS (Espaçador Transcrito Interno) do DNA ribossômico tenham surgido como uma alternativa viável para identificar a presença desse nematóide no indivíduo, essa técnica é dispendiosa e nem sempre é acessível para a população, levando em consideração que esta infecção está associada principalmente com baixo nível socioeconômico da população (JACOBS et al. 1997; GASSER, 2006).

O diagnóstico sorológico realizado através de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), trouxe avanços no imunodiagnóstico da toxocaríase humana, uma vez que, utiliza o antígeno excretado-secretado do *Toxocara* spp., (TES), no imunodiagnóstico da infecção por meio da quantificação de concentração de anticorpos IgG que são produzidos (MAGNAVAL et al. 2001). Apesar dos avanços, esta técnica tem uma baixa sensibilidade e baixa especificidade (DE SAVIGNY & TIZARD, 1977), outra desvantagem desse antígeno, quando produzido *in house*, é que para a sua

obtenção é preciso mão de obra qualificada para aquisição dos vermes, retirada dos ovos e cultivo das larvas e requer um tempo de espera de no mínimo três meses para obter uma concentração satisfatória de excretado-secretado das larvas (ALCANTARA-NEVES et al. 2008). Outra desvantagem desse antígeno é que para a sua utilização os soros precisam ser absorvidos previamente para eliminar a reação cruzada entre *Toxocara* spp. e *Ascaris lumbricoides*, pois em áreas de clima tropical e condições sanitárias baixas a infecção por *A. lumbricoides* é frequente (MENDONÇA et al. 2012). A obtenção do *Ascaris lumbricoides* para a produção do antígeno bruto também é um exemplo da desvantagem do uso deste antígeno no imunodiagnóstico de toxocaríase.

Uma sorologia positiva pode ainda ser confirmada por técnica de Western Blotting, pela identificação de bandas de baixo peso molecular 24 a 35 kDa (MAGNAVAL et al. 1991). Outro tipo de diagnóstico se faz pela dosagem de subtipos de imunoglobulinas específicas como por exemplo, IgG4 anti-*Toxocara*, por outro lado, a reatividade cruzada dessas imunoglobulinas (IgG ou IgG4) com antígenos de outros helmintos pode levar ao diagnóstico falso positivo (NOORDIN et al. 2005). O diagnóstico sobre a fase de infecção também não pode ser estabelecido pelo anticorpo IgM, porque essa imunoglobulina está presente em todas as fases da infecção (MAGNAVAL et al. 2013).

Tendo em vista todo esse conjunto de variáveis desfavoráveis para um imunodiagnóstico preciso da infecção por *Toxocara* spp., utilizando o antígeno secretado-excretado da larva do *Toxocara* spp., a produção e utilização de proteínas recombinantes presentes no excretado-secretado deste helminto tem demonstrado resultados satisfatórios, tanto aumentando a especificidade e a sensibilidade do imunodiagnóstico quanto se tornando uma ferramenta mais barata e mais rápida de aquisição (GASSER, 2006). Mohamad e colaboradores (2009), utilizando no imunodiagnóstico as moléculas recombinantes TES-26, TES-30 e TES-120 encontraram especificidades de 80% a 93% e sensibilidades de 96.2%, 93.9% e 92.0%, respectivamente. Outros estudos utilizando proteínas recombinantes: arginine kinase, cathepsin L-1, TES-30 e TES-26 do *Toxocara* spp., demonstraram o potencial

imunogênico dessas moléculas obtendo resultados mais precisos no imunodiagnóstico da toxocaríase humana, em termos de sensibilidade antígeno-anticorpo (VARGHESE et al. 2017; OLAVE et al. 2016).

O estudo mais recente publicado pelo nosso grupo, avaliando o potencial imunogênico das proteínas recombinantes MUC-3, TES-26, CTL-4 e TES-32 encontrou resultados ainda mais satisfatórios comparados aos encontrados nos estudos anteriores citados acima. Da Silva e colaboradores (2022), encontraram valores de sensibilidade entre 91.7% a 97.3% e especificidade de 94.0% a 97.9% utilizando IgG como anticorpo, já quando utilizou IgG4 como anticorpo encontraram resultados de sensibilidade de 88.8% a 98.3% e especificidade de 97.8% a 97.9%. Avaliando as moléculas rTES-26 e rCTL-4 combinadas os resultados foram ainda melhores, alcançando 100% de sensibilidade e especificidade utilizando o anticorpo IgG4, contrastando com o achado de Noordin e colaboradores (2005) que encontraram resultados insatisfatórios usando IgG4 como anticorpo no imunodiagnóstico de toxocaríase humana.

Embora tenha-se obtido um excelente resultado no trabalho supracitado (Da Silva et al. 2022), a obtenção de mais de uma molécula recombinante se dá de forma laboriosa e em termos financeiros ainda é de alto custo, elevando a necessidade da produção de uma única proteína recombinante que satisfaça os requisitos de sensibilidade e especificidade do imunodiagnóstico por ELISA indireto, que seja menos dispendiosa e mais fácil de ser produzida e padronizada.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A toxocaríase é uma das infecções parasitárias mais negligenciadas e prevalentes nas regiões tropicais e subtropicais, afetando principalmente populações de baixa renda com insuficiente controle de zoonoses. A soroprevalência é geralmente maior entre crianças devido ao maior contato com áreas contaminadas e hábitos de higiene menos rigorosos. No entanto, a infecção também afeta adultos, apresentando níveis variáveis entre áreas rurais e urbanas. A presença de cães e gatos não

vermifugados são os fatores de risco mais comuns para aquisição desta infecção, porém, alterações nos aspectos sociodemográficos podem contribuir para o aumento ou diminuição de novos casos desta infecção. Deste modo, a identificação destes fatores de risco dentro de uma população é crucial para monitoramento e prevenção de novos casos, pois oferece um quadro mais claro das populações mais vulneráveis.

O diagnóstico de toxocaríase é feito principalmente através da combinação do achado clínico laboratorial e com métodos sorológicos. Um dos métodos sorológicos mais utilizados é o imunodiagnóstico por ELISA indireto, baseado na pesquisa de anticorpos IgG anti-antígeno do TES do *Toxocara* spp., ou de proteínas recombinantes originárias de frações do TES. Portanto, o imunodiagnóstico atualmente utilizado de forma comercial ou produzido *in house* para toxocaríase apresenta algumas desvantagens devido a reação cruzada com infecções causadas por outros helmintos e alérgenos ambientais, e devido ao tempo gasto em se produzir o antígeno TES; usado para sensibilizar as placas de microtitulação. Dessa forma, nosso grupo na tentativa de aumentar a especificidade e sensibilidade dos métodos de imunodiagnóstico para *Toxocara* spp., produzimos duas moléculas recombinantes denominadas de CTL-4 e TES 26, que quando utilizadas em combinação apresentam 100% de especificidade e sensibilidade (DA SILVA et al. 2022). Contudo, a produção dessas moléculas ainda é muito laboriosa e requer diversas padronizações para garantir que as duas proteínas estejam presentes no ensaio em uma concentração equimolar. Portanto, dando continuidade, com o intuito de produzir um kit comercial para o diagnóstico da toxocaríase, produzimos uma única molécula baseada em epítomos de células B dessas duas proteínas recombinantes, e que a mesma apresentou especificidade e sensibilidade similar a combinação das moléculas parentais.



## 4. OBJETIVO

Determinar a soroprevalência de *Toxocara* spp. em um estudo prospectivo e avaliar a imunorreatividade de proteínas quiméricas recombinantes presentes no excretado-secretado do *Toxocara canis*.

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o imunodiagnóstico e determinar a soroprevalência de IgG anti-*Toxocara* spp., nos 926 soros do inquérito do SCAALA 2013;
- Comparar a soroprevalência de 2013 com a soroprevalência encontrada na mesma população em 2005 e determinar o número de casos novos e de remissão;
- Avaliar os fatores de risco para a infecção por *Toxocara* spp., e associar a infecção e com marcadores de atopia nos indivíduos nos dois anos de estudo;
- Construir uma proteína quimérica baseada em epítomos de células B das proteínas do *T. canis* TES 26 e CTL4;
- Realizar o imunodiagnóstico de toxocaríase por ELISA indireto, utilizando como antígenos as proteínas rTES 26, rCTL4 e as proteínas quiméricas construídas;
- Determinar qual proteína quimérica apresenta os melhores resultados em termos de sensibilidade, especificidade e acurácia no imunodiagnóstico da toxocaríase humana.

## 5. CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO SUBMETIDO NO PERIÓDICO: ALLERGIES- MDPI

### **A Roadmap to toxocariasis infection control: A comprehensive study on its impact, seroprevalence, and allergic implications in Latin America**

Raphael Chagas Silva<sup>1</sup>, Jaqueline Wang da Silva<sup>1</sup>, Antônio Marcio Santana Fernandes<sup>1</sup>, Camila Alexandrino Viana Figueiredo<sup>1</sup>, Natália Gomes de Moraes Coneglian<sup>1</sup>, Neuza Maria A. Neves<sup>1</sup>, Carina da Silva Pinheiro<sup>1\*</sup>.

Affiliation 1: Laboratory of Allergology and Acarology (LAA), Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador 40110-902, Brazil.

\*Correspondence: carina.pinheiro@ufba.br (C.S.P);

Tel.: +55 (71) 3283-8940 (C.S.P).

**Abstract:** Toxocariasis can manifest in humans as syndromes of visceral larva migrans, ocular toxocariasis, and neurotoxocariasis. Given its global prevalence, understanding the associated risk factors for infection is crucial. This study, conducted on the SCAALA cohort in Brazil from 2005 to 2013, aimed to prospectively analyze toxocariasis seroprevalence and identify pertinent risk factors for this infection. The prevalence on 926 serum samples was assessed by ELISA using *T. canis* excreted-secreted antigens. The risk factors were gathered through a questionnaire, with additional analysis of eosinophil count, sIgE and IL-10 levels, and Skin Prick Test results. IgG anti-*Toxocara* prevalence was 48% in 2005 and 53% in 2013, with 25% new cases in 2013. Advancing age and pet animal exposure were consistent risk factors, while higher maternal education and residing on a paved street were protective factors for this infection. Seropositive individuals exhibited a negative correlation with SPT reactivity, while the IgG anti-*Toxocara* positivity was linked to elevated IL-10 and eosinophil levels in both years, indicating a dual role of *Toxocara* spp. infection in initiating inflammation and regulating skin reactions through IL-10 cytokine production.

**Keywords:** *Toxocara*; Risk Factors; Seroprevalence; Eosinophilia.

## Introduction

Human toxocariasis stands as one of the most overlooked diseases caused by species from the *Toxocara* genera (*Toxocara canis* and *Toxocara cati*) across regions worldwide, including Latin America [1,2]. Human infection arises from the ingestion of embryonated eggs of *Toxocara* spp., and the subsequent disease emerges as larvae migrate through organs and systems, giving rise to the common forms of toxocariasis [3,4].

Although the toxocariasis may not manifest symptoms, clinical presentations encompass vision impairment, coughing, wheezing, eosinophilia, and headaches [5]. Additionally, larvae infection influences the host's immune responses, prompting a Th2 response and the release of cytokines like IL-4, IL-5, and IL-13 leading to eosinophilic inflammation and elevated levels of serum immunoglobulin E (IgE), which are also linked to the development of allergic symptoms [6,7].

Within the context of infection, an elevated level of eosinophils operates as a potent regulator against the infection [8]. However, certain studies propose that the safeguarding function of eosinophils diminishes in chronic helminth infections due to the secretion of IL-10 by Treg cells, employing a mechanism termed modified Th2 response [9]. Moreover, the release of regulatory IL-10 cytokine induced by helminths could contribute to mitigating the impact of Th2 proinflammatory cytokine reactions [10,11]. Nonetheless, this mechanism allows the helminth to evade the host's immune system, enabling its long-term survival within the host's body.

Given the broad potential for *Toxocara* spp. to infect various populations, it becomes imperative to establish strategies for preventing toxocariasis. Numerous studies have delineated a range of risk factors contributing to this infection, including age, exposure to contaminated soil, residence in areas with inadequate sanitation, limited education, presence of dogs and/or cats, and poor hygiene practices [12,13]. Notably, children are at heightened vulnerability to infection due to their increased exposure to contaminated environments, often displaying clinical symptoms linked to eosinophilic syndrome. In contrast, infection among adults could be linked to

occupational exposure, usually manifesting as either chronic asymptomatic infection or a mild eosinophilic syndrome [14,15].

Comprehending these risk factors across diverse populations and tracking their evolution over time is pivotal for preventing, diagnosing, and treating toxocariasis [16]. This prospective study was conducted within the same population during two distinct periods (2005 – 2013). Its primary objective was to identify sociodemographic shifts associated with the risk factors for acquiring *Toxocara* spp. infection. The aim was to construct a comprehensive roadmap for this infection, providing precise and comprehensive outcomes that can be harnessed for effective toxocariasis control.

## **Materials and Methods**

### **Study population**

This study was conducted in Salvador, located in Northeastern Brazil. Salvador has a population of over 2.900,319 individuals and is composed of people from various cities across the state. For this study, 926 sera samples were collected from the SCAALA (Social Change Asthma and Allergy in Latin America) project. The SCAALA project is a longitudinal study conducted in Latin America to assess the socioeconomic and demographic factors linked to asthma and allergic diseases over different years [17]. Children were initially enrolled in the SCAALA project in 2005, and they were re-enrolled for a second time in 2013 as part of the study's follow-up. Data concerning allergies, and socioeconomic-demographic status were gathered through standardized questionnaires in both years. Additionally, information regarding blood components (such as sIgE, eosinophils, and IL-10 concentration) was extracted from the SCAALA databases.

Ethical approval was obtained from the Brazilian National Ethical Committee (15.895/2011) and the Ethics Committee of the Institute of Collective Health of UFBA (003-05/CEP-ISC). Written and informed consent, outlining all the procedures to be conducted on the children, was signed by either the parents or legal guardians of each child (in 2005) or teenagers (in 2013).

### **Obtaining antigens from the excretory-secretory of *T. canis* larvae (TES)**

The technique used to obtain the excretory/secretory antigen of *Toxocara canis* (TES) followed the de Savigny method [18], which was adapted by Alcantara-Neves and colleagues [19]. The larvae were cultured in RPMI medium supplemented with gentamicin (160 µg/ml) and amphotericin B (2.5 µg/ml). The culture was maintained in a 5% CO<sub>2</sub> chamber at 37 °C. A solution of 0.1 M Phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF) from Sigma Chemical Co. (San Louis, MO, USA), was added to the collected supernatant. The culture supernatant was concentrated using an Amicon ultrafiltration device equipped with a cellulose filter with a pore size of 3000 kDa from Millipore Corporate, MA, USA. This concentration process took place at 4° C. The supernatant containing the TES was then preserved at -70 °C until it was ready for use.

### **Sera absorption with *Ascaris lumbricoides* antigen**

To prevent potential cross-reactions between IgG antibodies against *A. lumbricoides* and anti-*Toxocara* spp. antibodies, the sera underwent a pre-absorption process using *A. lumbricoides* extract. This absorption was conducted in the presence of polyethylene glycol (PEG 15,000 – Sigma Chemical Co., San Louis, MO, USA) at a concentration of 3%, along with 0.1% sodium azide diluted in PBS. Following an incubation period of 30 minutes at room temperature, the mixture was centrifuged, and the resulting supernatant was subjected to an additional round of absorption, as previously described. The absorbed material was subsequently frozen at -20 °C until the immunodiagnostic procedure was carried out.

### **Eosinophils counting, cytokine quantification Skin Prink Tests (SPTs)**

Obtained EDTA blood samples (5 mL) from children were utilized to determine eosinophils count using an automated counter (Counter Electronics Hialeah FL, USA). To assess the baseline production of IL-10 cytokine, a sandwich ELISA was conducted on whole blood supernatants from 261 individuals (121 positives and 140 negatives). Recombinant antibody pairs (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) were employed for this purpose, following the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations were determined by interpolating standard curves. The detection range

for IL-10 cytokine was established between 31.25 and 500 pg/ml. For Skin Prick Tests (SPTs), extracts (ALK-Abello, São Paulo, Brazil) of *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, *Blattella germanica*, and *Periplaneta americana* were applied to the right forearm of each child. Negative and positive controls consisted of saline and histamine, respectively. After a 15 minutes application period, the reaction to each allergen was assessed. A reaction was considered positive if the diameter of the papule was at least 3 mm greater than that of the negative control papule.

### **IgG antibody to *Toxocara* spp. detection from ELISA**

The presence of IgG antibodies against *Toxocara* spp. was assessed through indirect ELISA. In summary, 96-well plates were coated with 3.0 µg/mL of TES in a carbonate/bicarbonate buffer. Subsequently, the plates were blocked using a solution containing 10% fetal bovine serum (FBS) in PBS. The sera were diluted to 1:1.000 in a solution of PBS containing 0.05% Tween 20 and 2.5% FBS (PBS/T/FBS), and then added to the wells. Next, a biotinylated anti-human IgG conjugate (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) at a dilution of 1:4.000 in PBS/T/FBS was added, followed by Streptavidin-peroxidase (Streptavidin-HRP, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) at a dilution of 1:500 in PBS/T/FBS. The chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB - Sigma Chemical Co., San Louis, MO, USA) was introduced to initiate the reaction, which was halted using 2N sulfuric acid. The optical density was measured using a 450nm filter. Between each step, washing was carried out with PBS/T, followed by a single wash with PBS 1X. The plates were then incubated for an hour at room temperature after each step, except for the chromogen incubation, which lasted for 30 minutes.

For establishing the cut-off value, 13 serum samples from individuals with no history of contact with dogs or cats and eosinophils count of less than 2% were used as negative controls. The cut-off value was determined as the mean optical density plus three times the standard deviation.

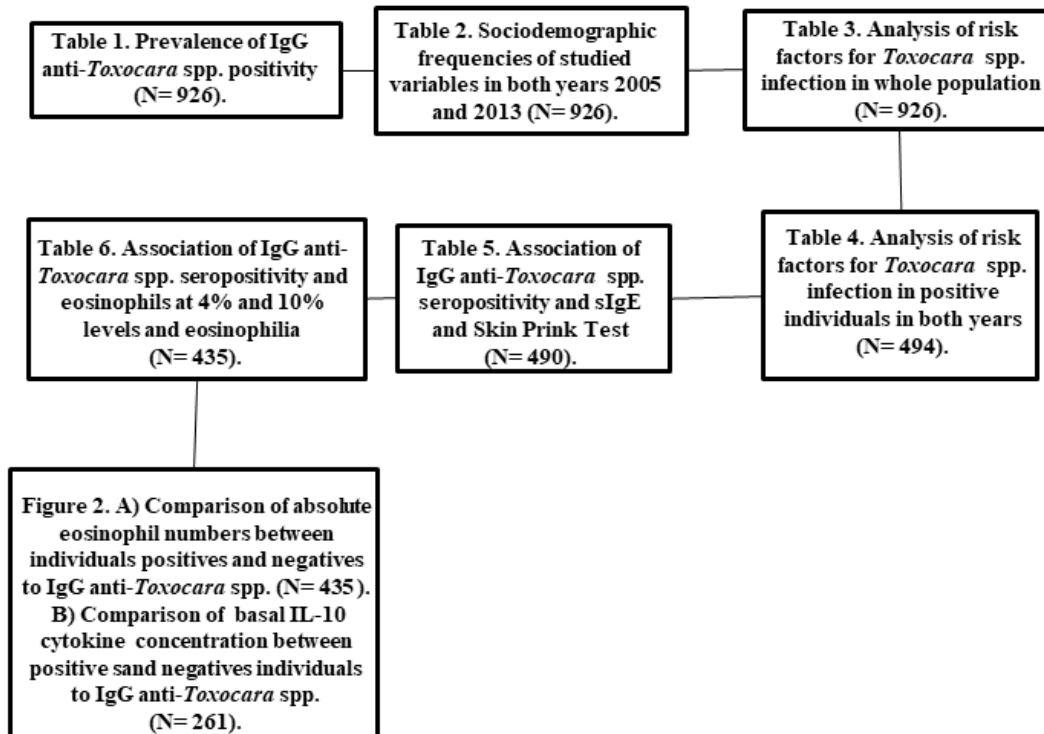
## **Data analysis**

To characterize the population, the analysis included only participants with complete data in both years. Descriptive analysis was employed to derive the frequencies and prevalence of the variables under study. The following factors were investigated as potential risk factors for acquiring *Toxocara* spp. infection (outcome): gender, age, maternal education, income, street paving, presence of dogs and cats. These same factors were considered confounding variables in the subsequent multivariate analysis.

Initially, a univariate analysis was conducted to examine the relationship between each potential risk factor and the outcome. A multivariable model was then constructed using standard logistic regression, including only the significant variables identified in the univariate analysis. The association between the outcome and the risk factors was quantified using odds ratios, 95% confidence intervals, and p-values of  $\leq 0.05$ . Both univariate and multivariate analyses were performed using SPSS version 24.0, and graphical representations were generated using GraphPad version 8.0.

## **Results**

The detailed flowchart was used to explain the difference between the numbers of individuals in each analysis. The statistical association and quantitative analyses in our study are influenced by variations in the number of individuals included in it. Only subjects who have provided complete data throughout a two-year study period were incorporated into this study (Figure 1).



**Figure 1.** Chronological order representation of results disposal through the article according to the number of individuals in each analysis.

### **Seroprevalence of IgG anti-*Toxocara* spp.**

The results from the *T. canis*-specific ELISA indicated a prevalence of 48% (n=450/926) in the year 2005 and 53% (n=490/926) in 2013. The prevalence of new cases in 2013 corresponded to 25% (n=236/926), while the number of sera exhibiting remission was 21% (n=195/926). Ultimately, the prevalence of positive IgG antibodies against *Toxocara* spp. in both years combined was 27% (n=254/926) (Table 1).



**Table 1.** Positivity to IgG anti-*Toxocara* spp. in 926 sera from the SCAALA population

<b>Prevalence to IgG anti-<i>Toxocara</i> spp.</b>	<b>n</b>	<b>n/N (926) %</b>
<b>Positivity</b>		
<b>Cases at 2005</b>	450	49
<b>Cases at 2013</b>	490	53
<b>New cases at 2013</b>	236	25
<b>Remission cases from 2005 to 2013</b>	195	21
<b>IgG positivity in 2005 and 2013</b>	254	27

### **Predictors of *Toxocara* spp. infection based on sociodemographic factors**

The original SCAALA population encompassed 1.445 children of varying ages, of whom 926 possessed a complete dataset and were included in the analysis. The study sample predominantly comprised individuals ranging from young children (0 to 5 years old in 2005) to adolescents and adults (16 to 19 years old in 2013); with roughly equal representation of both genders (51% males and 49% females). Several noteworthy sociodemographic attributes exhibited an increase over the two years. These included maternal education level, with 59% having completed up to the 2nd grade; household income, with 62% earning between 125 and 282.5 dollars; and the presence of paved streets, which rose to 81%. Furthermore, the prevalence of dogs and cats within households was lower in 2005 (40% for dogs and 18% for cats) compared to 2013 (65% for dogs and 63% for cats). Additionally, the proportion of individuals testing positive for anti-*Toxocara* spp. Antibodies were higher in 2013 as opposed to 2005 (53% and 49% respectively) (Table 2).

**Table 2.** Frequencies of sociodemographic variables to the study of risk factors for *Toxocara* spp. infection collected from SCAALA database

Variables	2005		2013	
	N= 926	n/N %	N= 926	n/N %
<b>Gender</b>	<b>N</b>		<b>N</b>	
Male	477	51	477	51
Female	499	49	499	49
<b>Age</b>				
<b>2005 / 2013</b>				
0 ≤ 5 / 11 ≤ 13	349	38	349	38
06 – 07 / 14 – 15	318	34	318	34
≥ 8 / ≥ 16	259	28	259	28
<b>Maternal Schooling</b>				
1st grade or less	219	24	174	19
Incomplete 2 <sup>nd</sup> grade	431	46	201	22
Complete 2 <sup>nd</sup> grade or more	276	30	551	59
<b>Incoming</b>				
≤ 125 dollars	759	82	317	35
125 ≤ 282.5 dollars	137	15	579	62
> 282.5 dollars	30	3	30	3
<b>Street paving</b>				
No	563	61	173	19
Yes	363	39	753	81
<b>Cat at home</b>				
No	758	82	625	67
Yes	168	18	301	33
<b>Dog at home</b>				
No	556	60	321	35
Yes	370	40	605	65
<b>IgG anti-<i>T. canis</i></b>				
No	476	51	436	47
Yes	450	49	490	53

All variables presented in the descriptive table (Table 2) underwent association analysis to identify potential risk or protective factors for *Toxocara* spp. infection. The results revealed an association between infection and children aged above 8 years, as well as the presence of cats and dogs, but only in 2005. Certain factors were identified as protective against *Toxocara* spp. infection, including maternal education beyond completing the 2nd grade in both 2005 and 2013. Additionally, an increase in income (in 2005) above \$282.5 was observed as a protective factor in the univariate analysis. The presence of paved streets was also linked to protection against infection in both years. Gender did not exhibit significant associations either as a risk or protective factor in this analysis for both years (Table 3).

**Table 3.** Analysis of risk factors linked to IgG anti-*Toxocara* spp. seropositivity in a cohort of 926 Individuals in 2005 and 2013

Variables	IgG Anti- <i>T.canis</i> positivity/ 2005 (n=450)			IgG Anti- <i>T.canis</i> positivity/ 2013 (n=490)		
	n/N (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>
<b>Gender</b>						
Male	230/477 (48)	1	1	249/477 (52)	1	1
Female	220/499 (44)	0.96 (0.74 - 1.25)	0.94 (0.72 - 1.23)	241/499 (48)	0.93 (0.72 - 1.22)	0.94 (0.72 - 1.22)
<b>Ages</b>						
<b>2005 / 2013</b>						
0 ≤ 5 / 11 ≤ 13	156/349 (44)	1	1	176/349 (50)	1	1
06 – 07 / 14 – 15	158/318 (50)	1.07 (0.82 - 1.41)	1.22 (0.89 - 1.67)	167/318 (52)	0.97 (0.74 - 1.28)	1.04 (0.76 - 1.43)
≥ 8 / ≥ 16	136/259 (52)	1.24 (0.99 - 1.65)	<b>1.42 (1.02 - 1.98)*</b>	147/259 (57)	1.24 (0.92 - 1.65)	1.20 (0.86 - 1.68)
<b>Maternal Schooling</b>						
1 <sup>st</sup> grade or less	129/219 (59)	1	1	103/174 (60)	1	1
Incomplete 2 <sup>nd</sup> grade	224/431 (52)	1.28 (0.99 - 1.66)	1.01 (0.69 - 1.49)	112/201 (56)	1.15 (0.84 - 1.5)	0.84 (0.55 - 1.28)
≥ Complete 2 <sup>nd</sup> grade	97/276 (35)	<b>0.45 (0.34 - 0.61)*</b>	<b>0.50 (0.36 - 0.69)*</b>	275/551 (50)	<b>0.74 (0.56 - 0.96)*</b>	<b>0.65 (0.46 - 0.93)*</b>
<b>Incoming</b>						
≤ 125 dollars	386/759 (51)	1	1	158/317 (50)	1	1
125 ≤ 282.5 dollars	55/137 (40)	<b>0.67 (0.46 - 0.96)*</b>	0.80 (0.54 - 1.19)	313/579 (54)	1.14 (0.87 - 1.48)	1.27 (0.96 - 1.68)
> 282.5 dollars	9/30 (30)	<b>0.44 (0.20 - 0.97)*</b>	0.50 (0.22 - 1.13)	19/30 (63)	1.55 (0.73 - 3.31)	2.13 (0.96 - 4.68)
<b>Street paving</b>						
No	290/563 (51)	1	1	105/173 (61)	1	1
Yes	160/363 (44)	<b>0.74 (0.56 - 0.96)*</b>	<b>0.72 (0.54 - 0.94)*</b>	385/753 (51)	<b>0.67 (0.48 - 0.94)*</b>	<b>0.68 (0.48 - 0.95)*</b>
<b>Cat at home</b>						
No	349/758 (46)	1	1	331/625 (53)	1	1
Yes	101/168 (60)	<b>1.76 (1.25 - 2.48)*</b>	<b>1.58 (1.10 - 2.28)*</b>	159/301 (53)	0.99 (0.75 - 1.31)	1 (0.75 - 1.35)
<b>Dog at home</b>						
No	253/556 (45)	1	1	175/321 (54)	1	1
Yes	197/370 (53)	<b>1.36 (1.04 - 1.77)*</b>	<b>1.27 (1 - 1.69)*</b>	315/605 (52)	0.90 (0.69 - 1.18)	0.91 (0.68 - 1.21)

The values were adjusted by variables: gender, age, mother scholarity, incoming, street pavementation, presence of dog or cat.

<sup>&</sup> n: number of positive individuals to IgG anti-*Toxocara* spp.; N: total number of individuals by variable.

\*Statistically significant values (CI: 0.05%; p< 0.05).

**Comparison of risk and protective factors for *Toxocara* spp. infection in individuals with persistent IgG anti-*Toxocara* spp. positivity over time (IgG positivity in 2005 and 2013)**

When examining the relationship between persistent IgG anti-*Toxocara* spp. positivity over the years, we analyzed the sociodemographic information of individuals in both 2005 and 2013. We then assessed the associations with infection-related risk factors. The increasing age was consistently identified as a risk factor in both years. Additionally, we found associations indicating that an increase in maternal education and street paving acted as protective factors in both 2005 and 2013. The presence of a cat at home was only associated as a risk factor in 2013. These associations are presented in detail in Table 4.

**Table 4.** Analysis of risk factors linked to IgG anti-*Toxocara* spp. seropositivity in 494 individuals testing positive in both years (2005 and 2013)

Variables	IgG Anti- <i>T. canis</i> positivity/2005 (n= 254)			IgG Anti- <i>T. canis</i> positivity/2013 (n= 254)		
	n/N (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>
<b>Gender</b>						
Male	132/262 (50)	1	1	132/262 (50)	1	1
Female	122/232 (52)	0.91 (0.64 - 1.30)	0.89 (0.61 - 1.29)	122/232 (52)	0.91 (0.64 - 1.30)	0.94 (0.65 - 1.36)
<b>Ages</b>						
<b>2005 / 2013</b>						
0 ≤ 5 / 11 ≤ 13	87/191 (45)	1	1	87/191 (45)	1	1
06 – 07 / 14 – 15	90/173 (52)	1.03 (0.71 - 1.50)	1.32 (0.86 - 2.03)	90/173 (52)	1.03 (0.71 - 1.50)	1.32 (0.86 - 2.03)
≥ 8 / ≥ 16	77/130 (59)	<b>1.53 (1.02 - 2.30)*</b>	<b>1.63 (1.02 - 2.61)*</b>	77/130 (59)	<b>1.53 (1.02 - 2.30)*</b>	<b>1.63 (1.02 - 2.61)*</b>
<b>Maternal Schooling</b>						
1 <sup>st</sup> grade or less	163/281 (58)	1	1	58/94 (61)	1	1
Incomplete 2 <sup>nd</sup> grade	41/74 (55)	1.20 (0.73 - 1.98)	0.89 (0.53 - 1.51)	71/112 (63)	<b>1.88 (1.22 - 2.90)*</b>	1.12 (0.62 - 2.03)
≥ Complete 2 <sup>nd</sup> grade	50/139 (36)	<b>0.41 (0.27 - 0.62)*</b>	<b>0.42 (0.27 - 0.65)*</b>	125/288 (43)	<b>0.45 (0.31 - 0.66)*</b>	<b>0.50 (0.30 - 0.81)*</b>
<b>Incoming</b>						
≤ 125 dollars	218/408 (53)	1	1	95/179 (53)	1	1
125 ≤ 282.5 dollars	30/68 (44)	0.71 (0.42 - 1.19)	0.89 (0.51 - 1.55)	154/303 (51)	0.94 (0.65 - 1.35)	1.02 (0.69 - 1.52)
> 282.5 dollars	6/18 (33)	0.46 (0.17 - 1.24)	0.54 (0.19 - 1.53)	5/12 (42)	0.66 (0.20 - 2.13)	0.93 (0.27 - 3.19)
<b>Street paving</b>						
No	174/307 (57)	1	1	60/93 (64)	1	1
Yes	80/187 (43)	<b>0.57 (0.39 - 0.82)*</b>	<b>0.57 (0.39 - 0.84)*</b>	194/401 (48)	<b>0.51 (0.32 - 0.82)*</b>	<b>0.52 (0.32 - 0.84)*</b>
<b>Cat at home</b>						
No	205/401 (51)	1	1	152/317 (48)	1	1
Yes	49/93 (53)	1.06 (0.67 - 1.67)	1.04 (0.63 - 1.70)	102/177 (57)	<b>1.47 (1.01 - 2.13)*</b>	<b>1.50 (1.00 - 2.26)*</b>
<b>Dog at home</b>						
No	143/282 (51)	1	1	79/157 (50)	1	1
Yes	111/212 (52)	1.06 (0.74 - 1.52)	1.11 (0.75 - 1.63)	175/337 (52)	1.06 (0.73 - 1.55)	0.94 (0.61 - 1.43)

The values were adjusted by variables: gender, age, mother scholarship, incoming, street pavementation, presence of dog or cat.

<sup>&</sup> n: number of positive individuals to IgG anti-*Toxocara* spp.; N: total number of individuals by variable

\*Statistically significant values (CI: 0.05%; p< 0.05).

### **Association analysis of *Toxocara* spp. infection, atopic markers, and eosinophils levels in the studied population**

The presence of IgG anti-*Toxocara* spp. antibodies did not demonstrate any associations with either risk or protective factors for specific IgE (sIgE) responses to aeroallergens (with cut-offs  $\geq 0.35$  kU/ml and  $\geq 0.75$  kU/ml) in both years. However, an association with Skin Prick Test results indicated a protective relationship in both years (Table 5). Furthermore, when comparing the association of risk factors with eosinophil levels (categorized as  $>4\%$ ,  $>10\%$ , and eosinophilia  $\geq 500$  mm<sup>3</sup>) and IgG anti-*Toxocara* positivity among 435 individuals in both years, we identified associations between *Toxocara* infection and eosinophil levels at 4% and 10%, as well as eosinophilia in 2005. In 2013, only eosinophilia demonstrated an association with this infection (Table 6).

**Table 5.** Association between seropositivity for IgG anti-*Toxocara* spp. and specific IgE (sIgE), as well as Skin Prick Test for at least one common aeroallergen in a study cohort of 490 individuals examined in 2005 and 2013

<i>Toxocara</i> <i>infection</i> 2005	n/N=490 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N=490 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N=490 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>
		<b>slgE≥0.35</b>			<b>slgE≥0.75</b>			<b>SkinPrink Test<sup>§</sup></b>	
No	109/248 (44)	1	1	168/319 (53)	1	1	82/344 (24)	1	1
Yes	133/242 (44)	1.36 (0.95 - 1.94)	1.42 (0.97 - 2.06)	82/171 (48)	0.82 (0.57 - 1.20)	0.91. (0.62 - 1.34)	64/146 (44)	<b>0.66 (0.44 - 0.97)*</b>	<b>0.72 (0.48 - 1.00)*</b>
<i>Toxocara</i> <i>infectio</i> /2013	n/N= 490 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N= 490 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N= 490 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>
		<b>slgE≥0.35</b>			<b>slgE≥0.75</b>			<b>SkinPrink Test<sup>§</sup></b>	
No	130/242 (44)	1	1	112/281 (40)	1	1	82/349 (23)	1	1
Yes	118/248 (44)	0.75 (0.53 - 1.07)	0.82 (0.56 - 1.24)	97/209 (46)	0.72 (0.50 - 1.03)	0.77 (0.53 - 1.13)	59/141 (42)	<b>0.59 (0.40 - 0.88)*</b>	<b>0.62 (0.41 - 0.93)*</b>

The values were adjusted by gender, age, mother scholarship, sewer service, street pavementation, parental asthma.

<sup>&</sup>n: number of positive individuals to IgG anti-*Toxocara* spp.; N: total number of individuals by variable.

\* Significant values are presented in Bold (p< 0.05).

<sup>§</sup>Skin PrinkTest and sIgE to *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus*, *D. farina*, *B. germanica* and *P. americana*.



**Table 6.** Association between seropositivity for IgG anti-*Toxocara* spp. and eosinophil levels at 4%, 10%, and eosinophilia ( $\geq 500$  mm<sup>3</sup>) in a study cohort of 435 individuals investigated in 2005 and 2013

<i>Toxocara</i> infection 2005	n/N=435 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N=435 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N=435 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>
		<b>&gt;4%</b>			<b>&gt;10%</b>			<b>Eosinophilia <math>\geq 500</math> mm<sup>3</sup></b>	
No	37/104 (35)	1	1	153/334 (45)	1	1	90/215 (42)	1	1
Yes	179/331 (54)	<b>2.13 (1.35 - 3.36)*</b>	<b>2.20 (1.36 - 3.57)*</b>	63/101 (62)	<b>1.96 (1.24 - 3.09)*</b>	<b>1.85 (1.15 - 2.98)*</b>	126/220 (57)	<b>1.86 (1.27 - 2.72)*</b>	<b>1.92 (1.28 - 2.86)*</b>
<i>Toxocara</i> infection 2013	n/N= 435 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N= 435 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>	n/N= 435 (%) <sup>&amp;</sup>	OR <sub>crude</sub>	OR <sub>adjusted</sub>
		<b>&gt;4%</b>			<b>&gt;10%</b>			<b>Eosinophilia <math>\geq 500</math> mm<sup>3</sup></b>	
No	133/275 (48)	1	1	191/390 (49)	1	1	164/349 (47)	1	1
Yes	83/160 (52)	1.15 (0.77 - 1.70)	1.57 (0.77 - 1.71)	25/45 (55)	1.30 (0.70 - 2.42)	1.38 (0.73 - 2.60)	52/86 (60)	<b>1.72 (1.06 - 2.79)*</b>	<b>1.74 (1.07 - 2.84)*</b>

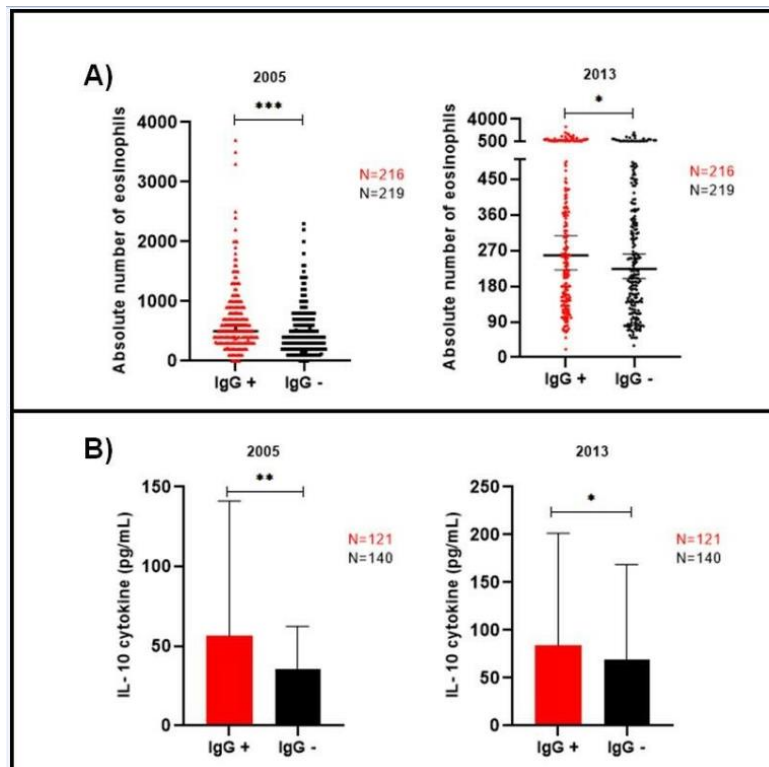
The values were adjusted by gender, age, mother scholarship, sewer service, street pavementation, parental asthma.

<sup>&</sup>n: number of positive individuals to IgG anti-*Toxocara* spp.; N: total number of individuals by variable.

\* Significant values are presented in Bold ( $p < 0.05$ ).

## Effects of *Toxocara* spp. infection on immunological features

To assess the impact of *Toxocara* spp. infection on immunological features, including eosinophil counts and basal IL-10 cytokine production in the blood, we extracted data from a database of 435 individuals for eosinophil counts and 261 individuals for basal IL-10 concentrations. Individuals with IgG anti-*Toxocara* spp. positivity exhibited elevated eosinophil counts compared to negative cases in both survey years. In the 2005 survey, positive individuals displayed eosinophil counts higher than 2.500 mm<sup>3</sup>/ml, while negative individuals showed counts lower than 2.500 mm<sup>3</sup>/ml ( $p < 0.0001$ ). Similarly, in 2013, the same pattern was observed, with positive individuals having counts higher than 1,900 mm<sup>3</sup>/ml and negatives having counts lower than 1.860 mm<sup>3</sup>/ml (Figure 2A). Additionally, in both 2005 and 2013, the baseline regulatory IL-10 cytokine concentration was higher among positive individuals ( $> 240$  pg/ml;  $> 400$  pg/ml, respectively) than in negative individuals ( $\leq 238$  pg/ml;  $\leq 300$  pg/ml, respectively) (Figure 2B).



**Figure 2.** Comparison of absolute eosinophil counts and spontaneous IL-10 concentrations between individuals positive and negative for IgG anti-*Toxocara* spp. in both years. A) The difference in eosinophils counts between 2005 and 2013 was assessed using the Mann-Whitney test, revealing significant

differences with p-values of 0.0001 and 0.037, respectively. B) Differences in basal IL-10 cytokine concentrations for 2005 and 2013 were evaluated through the Mann-Whitney test, yielding p-values of 0.008 and 0.020, respectively.

## Discussion

The SCAALA project collects sociodemographic information and examines associations concerning their potential involvement in the development of asthma and atopic diseases in Latin America [20]. Given that toxocariasis has been linked to immunological aspects associated with asthma and atopy, it becomes crucial to assess over time whether these variables are also correlated with *Toxocara* spp. infection. As it is established, children are more prone to acquiring *Toxocara* infection due to their increased exposure to contaminated environments [12]. Typically, with advancing age, this exposure diminishes, leading to a decline in infection rates among adolescents and adults, although this is subject to lifestyle contexts [21]. Therefore, it holds significance to identify potential infection risks to formulate strategies for prevention.

While we observed instances of remission of IgG anti-*Toxocara* spp. positivity in 191 individuals between 2005 and 2013, we also identified 236 new cases of positivity in 2013. Overall, the seroprevalence in both years remained comparable, assessed through the same method of immunodiagnosis (indirect ELISA). Additionally, studies have reported varying sensitivity levels of the anti-*TES* IgG method, even when using pre-adsorbed sera. This variance can be attributed to the fact that serum IgG antibodies are generated against diverse epitopes on the antigen's surface. Moreover, the number and species of serologically reactive antigens can significantly differ from person to person or from population to population, and the levels of specific antibodies may also vary with individuals' ages [22,23].

Consistent with findings from other studies conducted in Brazil [12] and Venezuela [24], although we did not observe an association between gender and IgG anti-*Toxocara* spp. positivity, we noted a higher prevalence of positivity in boys compared to girls. Earlier research has indicated that males are more susceptible to *Toxocara* infection due to their tendency to engage in outdoor activities and exhibit less hygienic practices,

leading to more frequent exposure to soil contaminated with *Toxocara* spp. eggs [14,25].

This same lifestyle trend could also relate to our age analysis. Children aged between 8 and 10 in 2005, as well as the same individuals in 2013 who were above 16 years old, were found to have a higher likelihood of acquiring *Toxocara* spp. infection compared to younger children. This could be attributed to the fact that younger children tend to follow parental guidance in terms of proper food handling and supervised hygiene practices such as hand washing and bathing before meals, resulting in a lower risk of infection [26].

Furthermore, we believe that the third age group, both in 2005 and 2013, was exposed to similar risk factors for *Toxocara* spp. infection. Previous studies have proposed that persistent exposure to *Toxocara* antigens leads to continued production of *Toxocara* spp. antibodies, potentially explaining the sustained IgG seropositivity against this helminth over the years, provided the sociodemographic features remain unchanged [27,28].

As documented, a higher level of education is linked to enhanced protection against helminth infections due to increased awareness of hygienic practices [29]. In our study, possessing a maternal education at a higher level was associated with a protective factor against *Toxocara* infection in both years. This finding is in line with other research that has demonstrated how an increase in educational attainment contributes to better comprehension of infection risks associated with roundworms [21,30]. Also, residing in an area with paved streets emerged as a protective factor against exposure to *Toxocara* eggs in our study. This suggests that a combination of elevated education levels and improved neighborhood conditions may collectively reduce the likelihood of infection. This aligns with studies that have indicated that better living conditions and infrastructure contribute to decreasing the risk of parasitic infections [31,32].

Furthermore, both stray and domesticated cats and dogs from low-income populations represented the primary sources of *Toxocara* spp. transmission, contributing to environmental contamination and thus perpetuating the spread of

infection among humans [4,21]. In the aggregate, higher *Toxocara* prevalence in 2005 was observed among dog owners (53%) and cat owners (60%) compared to those who did not own pets, categorizing this condition as a risk factor for infection acquisition. However, this pattern was not replicated in 2013, potentially attributable to the increased presence of protective factors during that period, such as heightened maternal education and income levels [33].

When focusing solely on individuals who tested positive in both years, our data indicated a higher prevalence of IgG anti-*Toxocara* spp. positivity among cat owners in both 2005 and 2013 (53% and 57%, respectively), as well as dog owners (52% in both years). We also observed a borderline association suggesting that being a cat owner might pose a risk for acquiring *Toxocara* spp. infection in 2013. This could potentially be attributed to an increased number of people keeping cats at home in 2013 (n=177) compared to 2005 (n=93). This rise in cat ownership may explain the emergence of new cases of individuals testing positive for IgG anti-*Toxocara* spp. in 2013. Despite cats being less frequently associated with human toxocariasis, they exhibit behaviors such as roaming outside the home, which could increase the likelihood of exposure to *Toxocara* eggs in contaminated soil. Moreover, cats might carry *Toxocara* eggs on their fur, potentially spreading them to other areas within the household and thus increasing the chances of human infection [34,35].

In our study, individuals who tested positive for IgG anti-*Toxocara* spp. in both years exhibited an association with the absence of skin reactivity in Skin Prick Tests (SPT). This lack of reactivity might be attributed to the "hygiene hypothesis," when the intensity of the infection triggers a Th2-skewed immunological response that seemingly shields the host from developing allergic symptoms [27]. Another explanation could stem from the chronic nature of the infection, leading to increased production of IgG4 antibodies instead of IgG. These circulating IgG4 antibodies might compete for binding sites with IgE on mast cells and basophils, potentially interfering with the onset of allergic symptoms [36].

Furthermore, our results from both years are partially consistent with a previous prospective cross-sectional study conducted by Phuc et al. (2021) [22]. The authors

examined a Spanish population and explored associations between *Toxocara* spp. seropositivity, SPT, and specific IgE ( $\geq 0.35$  kU/L and  $\geq 0.75$  kU/L) for common inhalant allergens. They found only a negative association with SPT analysis. Similarly, a study on a Zimbabwe cohort of individuals infected with Schistosomes helminths revealed a negative association with elevated expression of sCD23 and allergen specific IgE to house dust mites, compared to non-infected individuals. This sCD23 receptor functions as a low-affinity Fc $\epsilon$ RII transmembrane receptor for IgE on naïve IgM and IgD B cells, implying that helminth infection may play an inhibitory role in the development of allergic symptoms [27]. The influence of helminthiasis on the molecular mechanisms involved in atopic conditions remains unclear and warrants further investigation to comprehensively understand the regulation of antigen specific IgE in the context of helminth infections.

As *Toxocara* infection can induce both moderate and severe eosinophilia [37], we categorized eosinophil levels in our study based on prior investigations conducted by our research group, which examined the impact of toxocariasis on eosinophil levels [11,12]. Similar to the findings reported by other research groups demonstrating a connection between positivity to *Toxocara* infection and eosinophil levels [38,39], our study also indicated a positive association between *Toxocara* infection and eosinophil levels at >4% and >10% only in 2005. Additionally, we observed a positive correlation with eosinophil counts > 500 mm<sup>3</sup> in both years.

Children are more susceptible to acquiring helminth infections due to their less rigorous hygiene practices and increased likelihood of interacting with infected dogs or cats, often leading to polyparasitism and subsequently higher activation of eosinophils. Moreover, the higher number of eosinophils in positive individuals to IgG anti-*Toxocara* in both years corroborated studies from Brazil [26] and Kwait [40] which demonstrated the dependency of eosinophil levels on the duration of infection, parasitic load, and the affected organ. However, it's vital to consider that even though positive individuals exhibited higher eosinophil levels, the number of non-reactive and reactive sera evaluated was comparable. Thus, eosinophils counting should be employed as an additional tool for diagnosing individuals suspected of having toxocariasis.

Positivity for IgG anti-*Toxocara* spp. was observed to be inversely associated with the development of allergic symptoms as indicated by SPT. This phenomenon could be attributed to an elevated basal concentration of IL-10 among individuals who were positive for IgG anti-*Toxocara*. In addition to helminth infections stimulating IL-10 production, which subsequently triggers a shift in IgG "class switching" to IgG4, thereby hindering the binding of IgE to mast cells and the subsequent release of inflammatory mediators [41], the presence of IL-10 cytokine is linked to mitigating inflammatory responses in chronic infections. This occurs through the mechanism of shifting the Th2 immunological response towards a regulatory response mediated by Treg cells and the release of IL-10 cytokines. This phenomenon is often referred to as the "modified Th2 response" induced by helminth infections [23].

## **Conclusion**

The results primarily reflect trends in lifestyle within the population rather than other specific circumstances. The observed roadmaps of *Toxocara* infection in our population were mainly associated with individuals in the third age group and the presence of cats or dogs at home. To mitigate *Toxocara* spp. infection, potential sociodemographic changes such as enhancing maternal education levels and improving paved streets could be considered. Furthermore, the positivity for IgG-*Toxocara* was intrinsically linked to higher levels of IL-10 cytokine and eosinophils. Despite the high global prevalence of *Toxocara* spp. infection, there remains a lack of comprehensive understanding of the immune responses and modulation triggered by this infection and its connection to other allergic conditions. Investigating and gaining a detailed understanding of the involved risk factors and how to prevent them is essential for managing this neglected disease. Developing a roadmap of risk factors that can influence *Toxocara* spp. infection in a developing country like Brazil is crucial for disease management.

**Author Contributions:**

**RCS:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **JWS:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **AMSF:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **CFVA:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation. **NGMC:** Methodology, Formal analysis, Writing - review & editing. **NMAN:** Project administration, Funding acquisition, Resources. **CSP:** Project administration, Funding acquisition, Resources, Investigation, Methodology, Writing - review & editing. -

**Informed Consent Statement:**

Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:**

The data presented in this study are available on request from the corresponding authors. The data are not publicly available, due to issues in our university regarding cloud availability, which is not existent at the moment. In addition, there is the possibility of future patents.

**Declaration of Conflicts of Interest:**

The authors declare that they have no conflict of interest.

**Acknowledgments:**

We thank the individuals who contributed to this work, including laboratory technicians and students. The Wellcome Trust Foundation and the Brazilian agencies UNIVERSAL, CAPES, CNPQ, and FAPESB are also acknowledged for providing support for student fellowships.

**Funding**

As part of the SCAALA project this study was financially supported by The Wellcome Trust, UK, HCPC Latin America Excellence Centre Programme (072405/Z/03/Z). Brazilian agencies: UNIVERSAL, CAPES, CNPQ, and FAPESB are also acknowledged for funding this project.



## References

1. Moreira, G.M.; Telmo Pde, L.; Mendonca, M.; Moreira, A.N.; McBride, A.J.; Scaini, C.J.; Conceicao, F.R. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends in parasitology* **2014**, *30*, 456-464, doi:10.1016/j.pt.2014.07.003.
2. Ma, G.; Holland, C.V.; Wang, T.; Hofmann, A.; Fan, C.K.; Maizels, R.M.; Hotez, P.J.; Gasser, R.B. Human toxocariasis. *The Lancet. Infectious diseases* **2018**, *18*, e14-e24, doi:10.1016/S1473-3099(17)30331-6.
3. Fillaux, J.; Magnaval, J.F. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary parasitology* **2013**, *193*, 327-336, doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.028.
4. Arefkhah, N.; Shadzi, M.R.; Mikaeili, F.; Sarkari, B.; Esfandiari, F.; Goudarzi, F. Seroprevalence and associated risk factors of toxocariasis among nomads in Boyer-Ahmad County, southwest Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2020**, *114*, 372-377, doi:10.1093/trstmh/trz117.
5. Liu, E.W.; Chastain, H.M.; Shin, S.H.; Wiegand, R.E.; Kruszon-Moran, D.; Handali, S.; Jones, J.L. Seroprevalence of Antibodies to *Toxocara* Species in the United States and Associated Risk Factors, 2011-2014. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2018**, *66*, 206-212, doi:10.1093/cid/cix784.
6. Rodolpho, J.M.A.; Camillo, L.; Araujo, M.S.S.; Speziali, E.; Coelho-Dos-Reis, J.G.; Correia, R.O.; Neris, D.M.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; Anibal, F.F. Robust Phenotypic Activation of Eosinophils during Experimental *Toxocara canis* Infection. *Frontiers in immunology* **2018**, *9*, 64, doi:10.3389/fimmu.2018.00064.
7. Fica, A.; Jercic, M.I.; Navarrete, C. Brain lesions associated with eosinophilia. A useful clue for neurotoxocariasis. Report of one case. *Revista medica de Chile* **2021**, *149*, 1673-1678, doi:10.4067/S0034-98872021001101673.
8. Darlan, D.M.; Tala, Z.Z.; Amanta, C.; Warli, S.M.; Arrasyid, N.K. Correlation between Soil Transmitted Helminth Infection and Eosinophil Levels among Primary School Children in Medan. *Open access Macedonian journal of medical sciences* **2017**, *5*, 142-146, doi:10.3889/oamjms.2017.014.

9. Moreau, E.; Chauvin, A. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, *2010*, 428593, doi:10.1155/2010/428593.
10. Figueiredo, C.A.; Barreto, M.L.; Rodrigues, L.C.; Cooper, P.J.; Silva, N.B.; Amorim, L.D.; Alcantara-Neves, N.M. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. *Infection and immunity* **2010**, *78*, 3160-3167, doi:10.1128/IAI.01228-09.
11. Alcantara-Neves, N.M.; de, S.G.B.G.; Veiga, R.V.; Figueiredo, C.A.; Fiaccone, R.L.; da Conceicao, J.S.; Cruz, A.A.; Rodrigues, L.C.; Cooper, P.J.; Pontes-de-Carvalho, L.C.; et al. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC research notes* **2014**, *7*, 817, doi:10.1186/1756-0500-7-817.
12. Mendonca, L.R.; Veiga, R.V.; Dattoli, V.C.; Figueiredo, C.A.; Fiaccone, R.; Santos, J.; Cruz, A.A.; Rodrigues, L.C.; Cooper, P.J.; Pontes-de-Carvalho, L.C.; et al. *Toxocara* seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban Latin American. *PLoS neglected tropical diseases* **2012**, *6*, e1886, doi:10.1371/journal.pntd.0001886.
13. Macpherson, C.N. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *International journal for parasitology* **2013**, *43*, 999-1008, doi:10.1016/j.ijpara.2013.07.004.
14. Silva, M.B.; Amor, A.L.M.; Santos, L.N.; Galvao, A.A.; Oviedo Vera, A.V.; Silva, E.S.; Barbosa, C.G.; Goncalves, M.S.; Cooper, P.J.; Figueiredo, C.A.; et al. Risk factors for *Toxocara* spp. seroprevalence and its association with atopy and asthma phenotypes in school-age children in a small town and semi-rural areas of Northeast Brazil. *Acta tropica* **2017**, *174*, 158-164, doi:10.1016/j.actatropica.2016.04.005.
15. Laguna, J.; Rodriguez-Garcia, M.; Molina, A.; Merino, A. Kimura disease as an uncommon cause of persistent hypereosinophilia: a diagnostic challenge. *Biochimica medica* **2023**, *33*, 020801, doi:10.11613/BM.2023.020801.
16. Ikotun, K.; Sowemimo, O.; Chou, C.M.; Ajenifuja, K.; Chuang, T.W.; Asaolu, S.; Akinwale, O.; Gyang, V.; Nwafor, T.; Henry, E.; et al. High seroprevalence of *Toxocara*

antibodies in pregnant women attending an antenatal clinic at a university hospital in Ile-Ife, Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2020**, *114*, 301-307, doi:10.1093/trstmh/trz116.

17. Matos, S.M.; Jesus, S.R.; Saldiva, S.R.; Prado, M.S.; D'Innocenzo, S.; Assis, A.M.; Rodrigues, L.C.; Alcantara-Neves, N.M.; Cruz, A.A.; Simoes Sde, M.; et al. Overweight, asthma symptoms, atopy and pulmonary function in children of 4-12 years of age: findings from the SCAALA cohort in Salvador, Bahia, Brazil. *Public health nutrition* **2011**, *14*, 1270-1278, doi:10.1017/S1368980011000462.

18. Savigny, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *The Journal of parasitology* **1975**, *61*, 781-782.

19. Alcantara-Neves, N.M.; dos Santos, A.B.; Mendonca, L.R.; Figueiredo, C.A.; Pontes-de-Carvalho, L. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. *Experimental parasitology* **2008**, *119*, 349-351, doi:10.1016/j.exppara.2008.03.006.

20. Barreto, M.L.; Cunha, S.S.; Alcantara-Neves, N.; Carvalho, L.P.; Cruz, A.A.; Stein, R.T.; Genser, B.; Cooper, P.J.; Rodrigues, L.C. Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). *BMC pulmonary medicine* **2006**, *6*, 15, doi:10.1186/1471-2466-6-15.

21. Said, A.; Khattak, I.; Abbas, R.Z.; Khan, M.K.; Saleemi, M.K.; Budke, C.M.; Verocai, G.G. *Toxocara canis* seropositivity in different exposure groups in the Khyber Pakhtunkhwa province of Northwest Pakistan. *Parasitology research* **2023**, *122*, 1159-1166, doi:10.1007/s00436-023-07816-4.

22. Phuc, L.D.V.; Hai, T.X.; Loi, C.B.; Quang, H.H.; Vinh, L.D.; Le, T.A. The kinetic profile of clinical and laboratory findings and treatment outcome of patients with toxocariasis. *Tropical medicine & international health: TM & IH* **2021**, *26*, 1419-1426, doi:10.1111/tmi.13665.

23. Wang, H.; Tao, Y. Clinical Features and Prognostic Factors in Northern Chinese Patients with Peripheral Granuloma Type of Ocular Toxocariasis: A Retrospective Cohort Study. *Ocular immunology and inflammation* **2021**, *29*, 1259-1264, doi:10.1080/09273948.2020.1804592.
24. Martinez, M.; Montero, J.; Pineda, A.; Mijares, V.; Lares, M.; Catalano, E.; Ferrer, E. Epidemiological, clinical and laboratory features of toxocariasis in school children from Aragua State, Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2018**, *112*, 255-263, doi:10.1093/trstmh/try051.
25. Roldan, W.H.; Cavero, Y.A.; Espinoza, Y.A.; Jimenez, S.; Gutierrez, C.A. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the Amazonian city of Yurimaguas, Peru. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **2010**, *52*, 37-42, doi:10.1590/s0036-46652010000100006.
26. Mendonca, L.R.; Figueiredo, C.A.; Esquivel, R.; Fiaccone, R.L.; Pontes-de-Carvalho, L.; Cooper, P.; Barreto, M.L.; Alcantara-Neves, N.M. Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. *Acta tropica* **2013**, *128*, 90-95, doi:10.1016/j.actatropica.2013.06.018.
27. Flohr, C.; Tuyen, L.N.; Quinnell, R.J.; Lewis, S.; Minh, T.T.; Campbell, J.; Simmons, C.; Telford, G.; Brown, A.; Hien, T.T.; et al. Reduced helminth burden increases allergen skin sensitization but not clinical allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Vietnam. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **2010**, *40*, 131-142, doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03346.x.
28. Dana, D.; Vlaminck, J.; Ayana, M.; Tadege, B.; Mekonnen, Z.; Geldhof, P.; Levecke, B. Evaluation of copromicroscopy and serology to measure the exposure to *Ascaris* infections across age groups and to assess the impact of 3 years of biannual mass drug administration in Jimma Town, Ethiopia. *PLoS neglected tropical diseases* **2020**, *14*, e0008037, doi:10.1371/journal.pntd.0008037.
29. Jogi, N.O.; Svanes, C.; Siiak, S.P.; Logan, E.; Holloway, J.W.; Igland, J.; Johannessen, A.; Levin, M.; Real, F.G.; Schlunssen, V.; et al. Zoonotic helminth exposure and risk of allergic diseases: A study of two generations in Norway. *Clinical*

*and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **2018**, *48*, 66-77, doi:10.1111/cea.13055.

30. Rubinsky-Elefant, G.; Hirata, C.E.; Yamamoto, J.H.; Ferreira, M.U. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of tropical medicine and parasitology* **2010**, *104*, 3-23, doi:10.1179/136485910X12607012373957.

31. Dogan, N.; Dinleyici, E.C.; Bor, O.; Toz, S.O.; Ozbel, Y. Seroepidemiological survey for *Toxocara canis* infection in the northwestern part of Turkey. *Turkiye parazitolojii dergisi* **2007**, *31*, 288-291.

32. Won, K.Y.; Kruszon-Moran, D.; Schantz, P.M.; Jones, J.L. National seroprevalence and risk factors for Zoonotic *Toxocara* spp. infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **2008**, *79*, 552-557.

33. Rostami, A.; Riahi, S.M.; Holland, C.V.; Taghipour, A.; Khalili-Fomeshi, M.; Fakhri, Y.; Omrani, V.F.; Hotez, P.J.; Gasser, R.B. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases* **2019**, *13*, e0007809, doi:10.1371/journal.pntd.0007809.

34. Abbaszadeh Afshar, M.J.; Zahabiun, F.; Heydarian, P.; Mozafar Saadati, H.; Mohtasebi, S.; Khodamoradi, F.; Raissi, V. A Systematic Review and Meta-analysis of Toxocariasis in Iran: Is it Time to Take it Seriously? *Acta parasitologica* **2020**, *65*, 569-584, doi:10.2478/s11686-020-00195-1.

35. Eslahi, A.V.; Badri, M.; Khorshidi, A.; Majidiani, H.; Hooshmand, E.; Hosseini, H.; Taghipour, A.; Foroutan, M.; Pestehchian, N.; Firoozeh, F.; et al. Prevalence of *Toxocara* and *Toxascaris* infection among human and animals in Iran with meta-analysis approach. *BMC infectious diseases* **2020**, *20*, 20, doi:10.1186/s12879-020-4759-8.

36. Platts-Mills, T.A.; Woodfolk, J.A.; Erwin, E.A.; Aalberse, R. Mechanisms of tolerance to inhalant allergens: the relevance of a modified Th2 response to allergens from domestic animals. *Springer seminars in immunopathology* **2004**, *25*, 271-279, doi:10.1007/s00281-003-0149-8.

37. Despommier, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clinical microbiology reviews* **2003**, *16*, 265-272, doi:10.1128/CMR.16.2.265-272.2003.
38. Kim, H.S.; Jin, Y.; Choi, M.H.; Kim, J.H.; Lee, Y.H.; Yoon, C.H.; Hwang, E.H.; Kang, H.; Ahn, S.Y.; Kim, G.J.; et al. Significance of serum antibody test for toxocariasis in healthy healthcare examinees with eosinophilia in Seoul and Gyeongsangnam-do, Korea. *Journal of Korean medical science* **2014**, *29*, 1618-1625, doi:10.3346/jkms.2014.29.12.1618.
39. Pourgholaminejad, A.; Razipour, H.; Heydarian, P.; Ashrafi, K.; Roushan, Z.A.; Sharifdini, M. A survey on the seroprevalence of toxocariasis and related risk factors in Eosinophilic children of Northwest Iran. *African health sciences* **2022**, *22*, 617-625, doi:10.4314/ahs.v22i3.66.
40. Al-Awadhi, M.; Jamal, W. Seroprevalence of toxocariasis among allergic patients in Kuwait and its association with eosinophilia. *Parasite epidemiology and control* **2022**, *18*, e00260, doi:10.1016/j.parepi.2022.e00260.
41. Mazur-Melewska, K.; Figlerowicz, M.; Cwalinska, A.; Mikos, H.; Jonczyk-Potoczna, K.; Lewandowska-Stachowiak, M.; Sluzewski, W. Production of interleukins 4 and 10 in children with hepatic involvement in the course of *Toxocara* spp. infection. *Parasite immunology* **2016**, *38*, 101-107, doi:10.1111/pim.12303.

## 6. CAPÍTULO 2 – Manuscrito a ser submetido no periódico: Acta Tropica Journal

### Production and evaluation of new chimeric antigens to *Toxocara* spp. immunodiagnostic optimization

Authors: Raphael Chagas Silva<sup>a</sup>, Vitor Lima Miranda Melo<sup>a</sup>, Antônio Márcio Santana Fernandes<sup>a</sup>, Eduardo Santos da Silva<sup>a</sup>, Carolina Orrico Melo Ferreira de Jesus<sup>a</sup>, Álvaro Augusto Cruz<sup>b</sup>, Natália Gomes de Moraes Coneglian<sup>a</sup>, Neuza Maria A. Neves<sup>a</sup>, Carina da Silva Pinheiro<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Laboratory of Allergy and Acarology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia. Avenida Reitor Miguel Calmon, S/n, Vale do Canela, CEP: 40110-100. Salvador, Bahia, Brazil.

<sup>b</sup>Program of Asthma and Rhinitis Control (PROAR), Federal University of Bahia (UFBA), Bahia, Brazil.

\*Corresponding author's address: carinapinheiro@gmail.com.

#### HIGHLIGHTS

- Chimeric antigen build based on *Toxocara* spp. proteins had similar reactivity;
- IgG and IgG4 reactivity had better performance in non-absorbed serum;
- Shorten B-cells epitopes chimeric protein yielded more immunoreactiviness;
- rSHORT protein is a reliable protein to be used in toxocariasis diagnosis.

## Abstract

The development of a rapid, accurate diagnosis for toxocariasis, a largely ignored global health issue caused by *Toxocara* species, is very important. This disease, marked by the third-stage larvae's migration and the resulting Th2-driven inflammatory immune response, has long suffered from diagnostic challenges. Traditional methods relying on secreted-excreted *Toxocara* spp. antigens face significant limitations due to antibody cross-reactivity and the inconsistency of sensitivity and specificity, attributed to non-standardized methodologies. Our goal in this study was to develop a protein, based on B cell epitope from our previously identified proteins, to facilitate a rapid test for toxocariasis. As a result, we engineered and tested two chimeric proteins, rSHORT and rFULL, to improve the toxocariasis diagnostic procedure. Through comprehensive testing, including Dot Blot reactivity evaluation and comparative indirect ELISA using 232 sera samples from the Brazilian Program of Rhinitis and Asthma Control, our findings demonstrated the satisfactory reactivity and reliability of the rSHORT protein compared to the rFULL protein in both sensitivity and specificity across absorbed and non-absorbed sera. Specifically, rSHORT's IgG sensitivities reached 98.6% and 99.3%, and its specificities achieved 94.4% and 97.8% in absorbed and non-absorbed sera, respectively, showcasing its potential as a singular, robust diagnostic tool. The results of this study showed higher signal and overall better performance of the rSHORT protein, mirrored against both the mix of TES-26 and CTL-4 proteins and its counterpart rFULL. It highlighted its role as a strong candidate for the optimization of toxocariasis immunodiagnostic methods.

**Keywords:** *Toxocara*, Immunodiagnostic; Chimeras; Antibodies.



## 1- Introduction

Toxocariasis stands among the most reported neglected helminthiasis worldwide (Hotez and Wilkins, 2009). Human disease arises from infection by the infective L3 larval stage of the zoonotic species of roundworms: *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Mendonca et al. 2012). Comparatively, *T. canis* appears as the prevailing species, predominantly affecting human tissues and consistently appearing in diverse paratenic hosts under investigation (Chieffi et al. 2021). Furthermore, across most of the examined environments, *T. canis* eggs have been documented at a higher frequency than *T. cati*, underscoring its heightened zoonotic potential and explaining the elevated rate of human infection (Castro et al. 2018).

Infections by L3 larvae of *T. canis* in humans can either go unnoticed or lead to disease stages with mild or severe health consequences (Fillaux and Magnaval, 2013). Several symptoms and signs are associated with the infection; however, the disease's severity in humans depends on the affected tissue, the parasite loading, and the host's immune response intensity (Rostami et al. 2019).

The absence of symptoms and signs in human toxocariasis complicates clinical diagnosis. Furthermore, the absence of adult worms in the intestinal ducts precludes routine diagnosis based on fecal examination, as is the case with most soil-transmitted helminthiasis (STH) (Abbaszadeh Afshar et al. 2020). Since larvae or eggs cannot be found in parasitological examinations, the laboratory diagnosis of human toxocariasis relies on methods for visualizing parasite larvae, such as microscopic examination of affected tissues, recognized as the gold standard (Francalanci et al. 2023). The larvae can also be visualized in cerebrospinal or ocular fluids, but their identification can be challenging (Krasny and Sach, 2023; Lee et al. 2023). However, such methods have limited applicability in the clinical context due to the difficulty of detecting larvae associated with their small size and uncertain localization in affected tissues. In general, biopsy-based approaches are highly invasive procedures and are not recommended for diagnostic purposes (Dietrich et al. 2020).

Due to this limitation, the diagnosis of human toxocariasis is made based on clinical, serological and epidemiological criteria. Nowadays, the most used clinical method

for immunodiagnostic of toxocariasis is through ELISA, using native excreted-secreted antigens of L3 larvae of *T. canis* (TES), and it has been reported to have sensitivity and specificity ranging from 45% to 100% and 36% to 97%, respectively (Noordin et al. 2020; Skulinova et al. 2022). Variations in these parameters have been associated with the macromolecular composition of native TES antigens and the type and number of serum samples used for validation (Pouryousef et al. 2023; Santos et al. 2018). Despite the moderate reported performance for commercial and *in-house*-developed TES-ELISA its use is controversial due to the frequent cross-reactions to TES antigens with antibodies produced in response to antigens from other helminths, protozoa, and even house dust mites, which are highly prevalent in tropical countries (Caballero-Garcia et al. 2019; Da Silva et al. 2022; Munoz-Guzman et al. 2010). Moreover, the production of this antigen requires skilled technicians and typically involves expensive and non-reproducible methodologies, affecting the quantity, quality, and composition of the excreted-secreted TES antigens (Alcantara-Neves et al. 2008).

Mostly in the developing country, the underreported cases of *Toxocara* spp. are occasioned by limitations of available diagnostic tools and insufficient awareness of human toxocariasis among population and medical professionals, which result in a significant burden on the healthcare system (Mengarda et al. 2023; Santarem et al. 2023). The attempting of develop antigens based on recombinant proteins from native-TES that offers improved sensitivity and specificity in diagnosis of toxocariasis is a priority (Baharudeen et al. 2022; Varghese et al. 2017). Moreover, the utilization of recombinant TES antigens in ELISA test has arisen due to their notable benefits in antibodies detection and their limitless production capability (Yamasaki et al. 2000). For this reason, a previous study performed by our research group characterized and tested by ELISA four recombinant proteins identified through proteomic assay and the combination of two proteins (TES-26 and CTL-4) allowed 100% of sensibility and specificity to detect IgG4 anti-*Toxocara* spp. antibodies and the results of IgG detection were satisfied as well (Da Silva et al. 2022). Therefore, the objective of this study was to synthesize, express, and evaluate two chimeric proteins, derived from rTES-26 and rCTL4 proteins identified in the aforementioned research, for use as an alternative diagnostic method for *Toxocara* spp.

infection. This approach seeks to offer a substitute to the traditional TES-ELISA, aiming for application in point-of-care diagnostics.

## **2 - Material and methods**

### **2.1- Human sera samples**

In this study, we tested 232 serum samples randomly selected from individuals aged 19 to 82 years, who are enrolled in the Asthma and Rhinitis Control Program (PROAR) in Salvador, Bahia, Brazil. These blood samples were collected into heparinized tubes (Compania Benckton Dickson, Franklin Lakes, USA) and were specifically utilized for indirect ELISA to identify IgG and IgG4 antibodies targeting *Toxocara* spp. antigens.

### **2.2- Construction of chimeric genes of *T. canis* rSHORT and rFULL**

Two recombinants chimeric genes were constructed upon selection of B-cells epitopes score from TES-26 and CTL4 *Toxocara* spp. proteins using the IEDB platform (<https://www.iedb.org>). The TES-26 and CTL-4 sequences were retrieved from a previous study performed by our research group (Da Silva et al. 2022). The small chimeric protein (rSHORT) is a combination of the highest B-cell score of TES-26 and CTL4 epitopes (4 and 3 B-cell epitopes, respectively). While the second chimeric protein (rFULL) was constructed using the whole panel of probable B-cell epitopes with scores ranging from 0.70 to 0.99 (7 from TES-26) and from 0.74 to 1(7 from CTL4). Peptide linkers EAAAK and KK were placed in the construction of the chimeras to allow molecules stability, flexibility and immunoreactivity. The chosen sequences were harmonized on GenScript (<https://www.genscript.com>) and optimized on Tsigner server (<https://tsigner.com>) to improve the expression score and they are placed in figure 1 A and B. The tertiary structures were visualized in the software AlphaFold2 (<https://alphafold2.ipynb>). The pET-21a(+) was the chosen vector to cloning the built sequences.

### **2.3- Transformation, heterologous expression and purification method of *T. canis* chimeric proteins**

The transformation and expression of the two chimeric recombinants were conducted using the same protocol. Initially, *Escherichia coli* BL21 (DE3) colonies grown overnight were introduced into a 1 M calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) solution along with 2 µL of ampicillin-resistant plasmids, then placed on ice for 30 minutes. Following this, the mixtures underwent a heat shock in a 46 °C water bath for 2 minutes and then were cooled on ice for 30 minutes. The bacterial suspensions were then incubated in 1 mL of Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C with shaking for one hour. To verify successful transformation, the suspensions were spread on LB-agar plates with ampicillin and incubated overnight at 37 °C.

The expression of chimeric recombinant proteins was carried out under conditions similar to those used for the original recombinant proteins (Da Silva et al. 2022). After transformation, 5 mL of the bacterial suspension was added to 1 L of LB medium with supplements and agitated at 200rpm until reaching an optical density (OD<sub>600</sub>) of 0.6- 0.8. Expression was induced with Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and continued for 4 hours at 37°C. The cultures were then centrifuged to collect bacterial pellets, which were resuspended in 50 mM sodium phosphate buffer (NaP buffer), pH 9. At least eight sonication cycles of 20 seconds each at 40 Hz were performed on ice to lyse the cells. After centrifuging the lysed material at 13,000 x g for 40 minutes at 4 °C, the supernatant was collected and the presence of the proteins was confirmed through 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), with bands corresponding to rSHORT (17 kDa) and rFULL (38 kDa).

Purification was achieved via affinity chromatography on an AKTAPure system using a 5 mL nickel column HisTrap FF (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The proteins were eluted with 50 mM NaP buffer supplemented with 100–500 mM imidazole. The purified proteins were then pooled and dialyzed against 1X PBS. Protein concentrations were determined using the Bradford assay. Western blot analysis was performed for immunodetection of the purified proteins, employing anti-his antibody diluted in 0.05% PBS-tween (1:4000), followed by the addition of goat anti-human IgG antibody conjugated

with horseradish peroxidase (HRP) diluted in 1X PBS (1:4000) for 1 hour with shaking. The detection reaction was conducted using the ECL Western Blotting Substrate (ThermoScientific 32106, Waltham, Massachusetts, USA).

#### **2.4- Dot Blot assay using *T. canis* chimeric recombinant proteins rSHORT and rFULL as antigens to reactivity assessment**

In this analysis were used *T. canis* chimeric recombinant proteins rSHORT and rFULL and the mix of *T. canis* proteins (TES-26 and CTL-4) as the baseline. A concentration of 4.5 µg diluted in PBS 1X of each chimeric protein, even the mix of antigens was added in an equimolar concentration and then employed in the nitrocellulose membrane through a tank blotting system (BioRad) and incubated for 1 hour at room temperature. The membranes were then blocked in PBS 1X supplemented with 5% skim milk, during 2 hours of incubation at RT and then divided into strips. Following this, previous non-adsorbed sera (20 positives and 16 negatives) tested by TES-ELISA were added in the strips and incubated for 2 hours under agitation at RT. Then, anti-human IgG phosphatase-conjugated antibody diluted in PBS 1X (1:4000) was added in incubated for 1 hour under agitation. The reaction was revealed using a BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma–Aldrich. Saint Louis, MO, USA) for 15 min of incubation in the dark. The membranes underwent a series of washes between steps: five washes with PBS-tween 0.05% and one additional wash with PBS 1X.

#### **2.5- Sera absorption with *Ascaris lumbricoides* antigen**

All sera were pre-adsorbed with 8 µg of *A. lumbricoides* somatic extract antigens in order to avoid IgG anti-*A. lumbricoides* and anti-*Toxocara* spp. antibodies cross-reaction. The sera were adsorbed in the presence of polietilenoglicol (3%) (PEG 15.000 – Sigma Chemical Co., San Louis, MO, USA) and 0.1% sodium azide diluted in PBS. This solution was incubated for 30 minutes at 4 °C under homogenization. Then, the material was centrifuged and the adsorbed supernatant was adsorbed one more time, as described above, and frozen at -20 °C until the immunodiagnostic was performed.

## **2.6- IgG and IgG4 ELISA using purified mix of rTES-26/rCTL-4, rSHORT and rFULL chimeric antigens**

Optimal antigen concentrations were determined using a combination of positive serum samples and conjugated antibody (specifically, anti-human IgG peroxidase-conjugated antibody) through a checkerboard titration experiment using seven distinct concentrations: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, and 20 µg/mL. The recombinant proteins were diluted in carbonate/bicarbonate buffer with a pH of 9.6. These were then applied to high-binding 96-well ELISA plates made of polystyrene and incubated overnight at 4 °C. To prevent nonspecific binding, the plates were blocked with 100 µl of PBS containing 0.05% Tween and 10% bovine fetal serum (BFS) for 1 hour at room temperature (RT). Pre-adsorbed and non-adsorbed sera (100 µl; IgG sera dilution: 1:1000 and IgG4 sera dilution: 1:50) were applied in different plates and incubated for 1 hour at RT. Subsequently, 100 µl of a diluted (1:4000 and 1:500) secondary antibody (biotinylated anti-human IgG or anti-human IgG4 from BD Pharmingen, respectively. San Jose, CA, USA) was added and incubated for 1 hour at RT. Following this step 100 µl of streptavidin-peroxidase (BD Pharmingen) diluted to a 1:500 in PBS/T/BFS 2.5% was added to each well and then incubated for 30 minutes at RT. Subsequently, 100 µl of a solution containing the chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB - Sigma Chemical Co., San Louis, MO, USA) was added and the reaction was revealed during 30 min and 50 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to halt the reaction in each well. Optical densities (OD) were measured at a wavelength of 450 nm using a spectrophotometer. The detection limit was determined using the assay's cutoff point, calculated based on the average optical densities (OD) plus three times the standard deviation of the results obtained from 15 serum samples collected from healthy individuals. These individuals tested negative for intestinal helminthes and were seronegatives for *Toxocara* spp. infection using the combination of rTES-26 and rCTL-4 as antigens in previous ELISA.

### **2.6- Statistical analysis**

The Kolmogorav–Smivov test was used to analyses data normality. Positive/negative (P/N) values were used for data normalization of different batches of

ELISA results. To calculate the area under the curve (AUC) and the receiver operating characteristics (ROC) we used the MedCalc Software and 95% confidence intervals (95% CI) following the bootstrap method (1000 replicates) to achieve sensitivity and specificity pairwise comparison of the diagnostic performance. The most probable cut-off point value was defined as the OD values that yielded the highest sum of sensitivity and specificity, and positive and negative predictive values were calculated as previously described (Barral et al. 2019). All data are presented as mean of duplicate samples. Student's t-test and one-way ANOVA were used for comparison between groups and significance was set at  $p < 0.05$ .

### **3- Results**

#### **3.1. Design, expression and purification of *T. canis* rSHORT and rFULL chimeric recombinant antigens**

Based on *T. canis* chimeric epitopes scores, we decided to synthesize chimeric prototype genes, termed rSHORT and rFULL. Schematic illustrations representing design and 3D tertiary structures of *T. canis* rSHORT and rFULL chimeric genes are shown in Figure 1 A (for rSHORT) and E (for rFULL). Gel electrophoresis and Western Blotting results of non-purified and purified recombinant antigens are showed on Figure 1 B and C for rSHORT and Figure 1F and G for rFULL. Red arrows for rSHORT (17 kDa) and rFULL (38 kDa) highlight the molecular weight. Figures 1D and 1H demonstrate the uniformity and purity of the generated recombinant proteins, confirming the consistency of affinity chromatography.

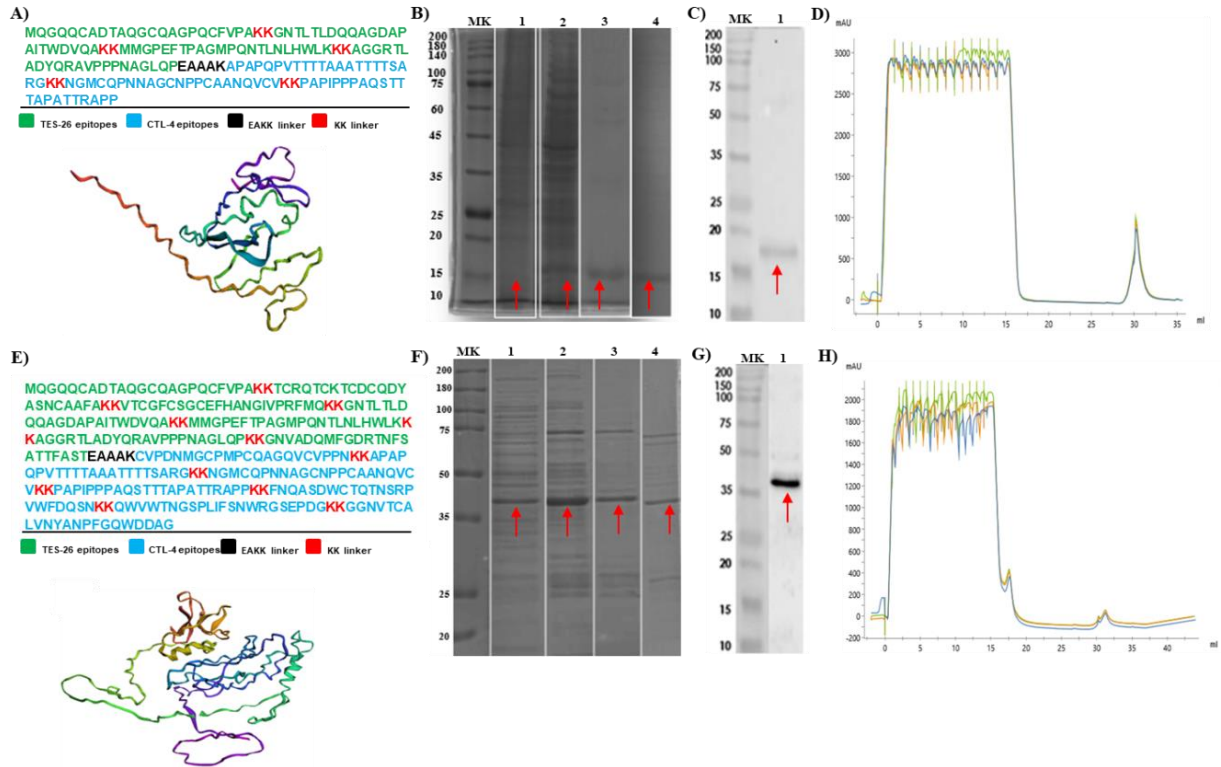


Figure 1. Design and in vitro characterization of chimeric recombinant proteins (rSHORT and rFULL). A) Construction scheme of rSHORT gene based on IEDB B-cells epitopes scores and the predictable tertiary structure of rSHORT was accessed on AlphaFold2. B) 15% SDS-PAGE for expression of rSHORT protein (Lane 1 – 0 hours, before IPTG induction; Lane 2 – 4 hours of expression,  $OD_{600} = 0.6 - 0.8$ ; Lane 3 – Purified protein by affinity chromatography; Lane 4 – Dialyzed protein on PBS 1X overnight). C) Representative Western Blotting result for rSHORT protein (Lane 1 – The recognition of antibody against the histidine tail on the purified protein). D) Four overlapping affinity chromatograms for rSHORT purifications. E) Construction scheme of rFULL gene based on IEDB B-cells epitopes scores and the predictable tertiary structure of rFULL was accessed on AlphaFold2. F) 12% SDS-PAGE for expression of rFULL protein (Lane 1 – 0 hours, before IPTG induction; Lane 2 – 4 hours of expression,  $OD_{600} = 0.6 - 0.8$ ; Lane 3 – Purified protein by affinity chromatography; Lane 4 – Dialyzed protein on PBS 1X overnight). G) Representative Western Blotting result for rFULL protein (Lane 1 – The recognition of antibody against the histidine tail on the purified protein). H) Four overlapping affinity chromatograms for rFULL purifications. The displayed red arrows are shown the molecular weight of each protein (17 kDa for rSHORT and 38 kDa for rFULL, approximately).



### **3.2. Dot Blot assay and indirect ELISA using *T. canis* mix (rTES26/rCTL-4 proteins) and rSHORT and rFULL chimeras as antigens to reactivity assessment**

The reactivity of chimeric rSHORT, rFULL, and the rTES26/rCTL-4 protein combination was evaluated through dot blot. As it is shown in figure 4 (S1-Supplementary Material), in positive sera, the combined proteins yielded the highest reactivity, followed by rSHORT, which showed comparable results in term of reaction with the combined proteins. rFULL displayed the lower reactivity. Negative sera exhibited reduced reactivity to all proteins compared to positive sera (Figure 4, S1-Supplementary Material).

The serum reactivity of IgG and IgG4 antibodies to recombinant antigens (rSHORT and rFULL) of *T. canis* was assessed, using the humoral response to the rTES26 and rCTL-4 combination. A validation panel was established for both absorbed and non-absorbed sera, and the results are summarized in Table 1. The IgG ELISA, utilizing absorbed sera and rSHORT and rFULL as antigens, demonstrated sensitivities of 98.6% and 93.7%, respectively, along with specificities of 94.4% and 86.7%, respectively. For IgG4, sensitivities of 96.5% and 88.0% were observed for rSHORT and rFULL, with specificities of 92.2% and 87.8%, respectively.

The assessment of non-absorbed sera reactivity to both IgG and IgG4 antibodies demonstrated superior sensitivity and specificity compared to absorbed sera when using rSHORT as antigen. We observed for rSHORT sensitivities of 99.3% for IgG and 98.5% for IgG4, along with specificities of 97.8% for IgG and 97.7% for IgG4. When rFULL was used the sensitivities were 89.4% for both IgG and IgG4, and specificities were 81.1% for IgG and 87.8% for IgG4. The rSHORT exhibited enhanced predictive values and Kappa index ( $k$ ) for both IgG and IgG4 compared to rFULL (PPV= 98.6% and 98.3%; NPV= 98.8% and 97.7%;  $k$  index= 0.97 and 0.96, IgG and IgG4, respectively) (Table 1).

**Table 1.** Validation parameters for the ELISAs designed to detect total IgG and IgG4 antibodies against *T. canis*, using recombinant antigens

Parameters	Recombinant proteins/Adsorbed sera				Recombinant proteins/Non-adsorbed sera			
	rSHORT		rFULL		rSHORT		rFULL	
	Total IgG	IgG4	Total IgG	IgG4	Total IgG	IgG4	Total IgG	IgG4
<b>Total samples</b>	<b>232</b>							
<b>Positive controls</b>	<b>142</b>							
<b>Negative controls</b>	<b>90</b>							
<b>Truly positives</b>	<b>140</b>	<b>137</b>	<b>133</b>	<b>125</b>	<b>141</b>	<b>140</b>	<b>127</b>	<b>128</b>
<b>Truly negatives</b>	<b>85</b>	<b>83</b>	<b>77</b>	<b>79</b>	<b>88</b>	<b>88</b>	<b>73</b>	<b>79</b>
<b>False negatives</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>15</b>	<b>14</b>
<b>False positives</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>17</b>	<b>11</b>
<b>Cut-off</b>	<b>0.253</b>	<b>0.237</b>	<b>0.199</b>	<b>0.201</b>	<b>0.259</b>	<b>0.243</b>	<b>0.187</b>	<b>0.210</b>
<b>Sensitivity (%)</b>	<b>98.6%</b>	<b>96.5%</b>	<b>93.7%</b>	<b>88.0%</b>	<b>99.3%</b>	<b>98.5%</b>	<b>89.4%</b>	<b>89.4%</b>
<b>Specificity (%)</b>	<b>94.4%</b>	<b>92.2%</b>	<b>86.7%</b>	<b>87.8%</b>	<b>97.8%</b>	<b>97.7%</b>	<b>81.1%</b>	<b>87.8%</b>
<b>Accuracy (%) *</b>	<b>96.98%</b>	<b>94.83%</b>	<b>90.52%</b>	<b>87.93%</b>	<b>98.71%</b>	<b>98.28%</b>	<b>86.21%</b>	<b>89.22%</b>
<b>PPV (%)</b>	<b>96.55%</b>	<b>95.14%</b>	<b>91.10%</b>	<b>91.91%</b>	<b>98.60%</b>	<b>98.59%</b>	<b>88.19%</b>	<b>92.09%</b>
<b>NPV (%)</b>	<b>97.70%</b>	<b>94.32%</b>	<b>89.53%</b>	<b>82.29%</b>	<b>98.88%</b>	<b>97.78%</b>	<b>82.95%</b>	<b>84.95%</b>
<b>Kappa (K)**</b>	<b>0.93</b>	<b>0.89</b>	<b>0.79</b>	<b>0.74</b>	<b>0.97</b>	<b>0.96</b>	<b>0.70</b>	<b>0.77</b>

\* Accuracy was calculated by the proportion of correct results, i.e., the total of truly positive plus truly negative results.

\*\* The level of agreement between the results of each ELISA and the mix (TES-26 e CTL-4) ELISA was determined using the Kappa index (K).

In addition, the areas under curve (AUC) of each assay were assessed to determine the diagnostic accuracy of individual antigens through ROC Curves (Figure 2, A-D). In non-absorbed sera tested, the rSHORT antigen yielded the highest accuracy value for IgG and IgG4 (98.7% and 98.2%, respectively) (Table 1).

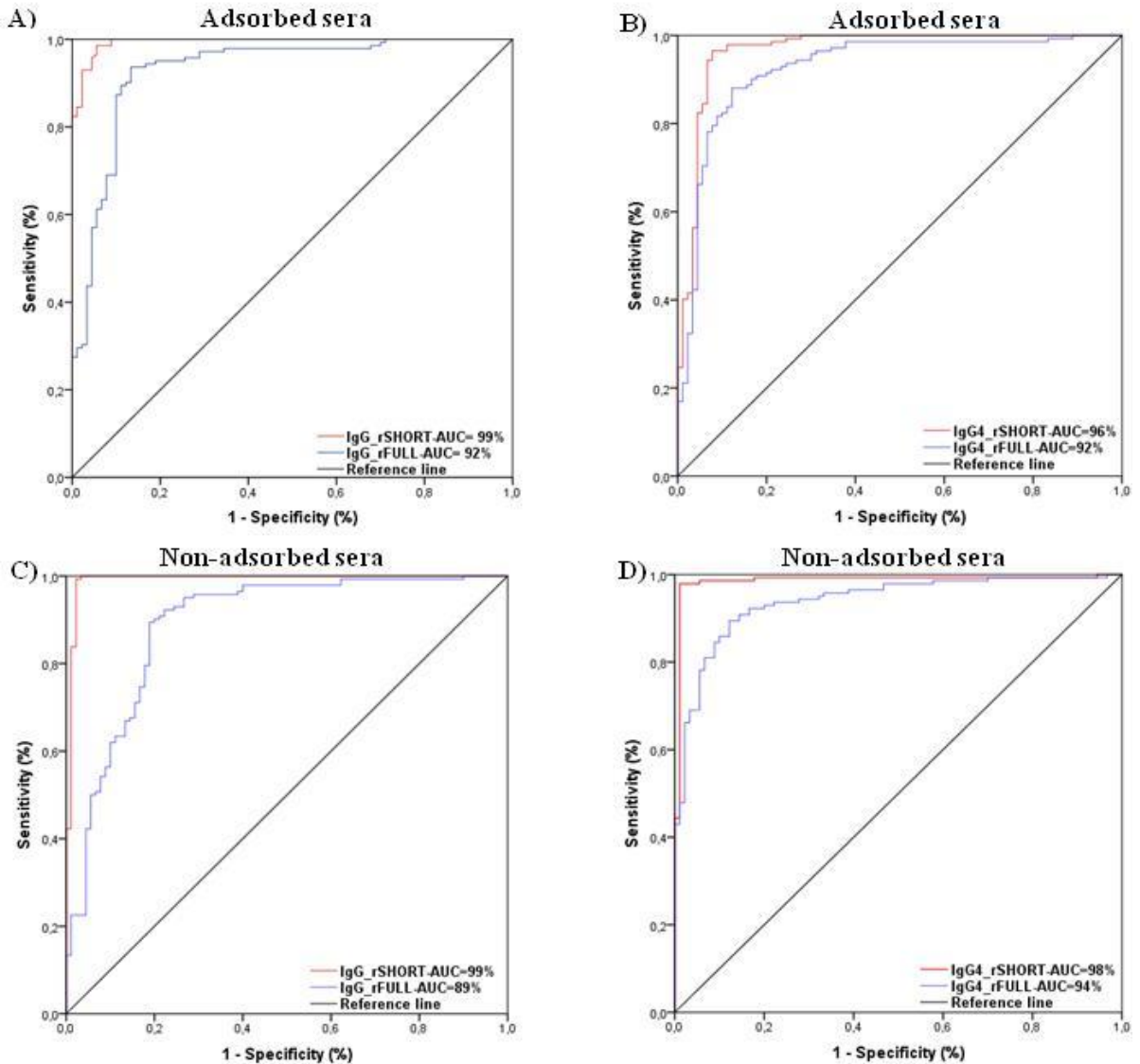


Figure 2. ROC curves analysis for rSHORT and rFULL chimeric antigens. Blue line- rFULL's ODs; Red line- rSHORT's ODs. Positive and negative serum samples underwent IgG and IgG4 ELISA testing, with the area under the curve reflecting test accuracy. Recombinant molecule recognition was assessed using IgG and IgG4 immunoassays for individual proteins in adsorbed sera (A and B) and non-absorbed sera (C and D), the AUC were determined using a p-value  $\leq 0.001$ .

### 3.3. Comparison of reactivity among recombinants proteins and the mix of proteins by indirect ELISA with the best profile for toxocariasis immunodiagnostic

The reactivity of the chimeric proteins rSHORT and rFULL was compared to that of the protein mixture (rTES26/rCTL-4) using cut-off values derived from ROC curve

analysis. In the case of non-absorbed sera, rSHORT antigen demonstrated greater accuracy for both IgG and IgG4, which were aligned with the protein mixture. Notably, the incidence of false positives was higher in absorbed sera than in non-absorbed sera for both IgG (absorbed, n=5; non-absorbed, n=2) and IgG4 (absorbed, n=7; non-absorbed, n=2), as illustrated in Figure 3, panels A through D. Furthermore, the rSHORT usage allowed the decreases of false negatives occurrence in non-absorbed sera compared to absorbed sera, as for IgG (non-absorbed, n=1; absorbed, n=2) as for IgG4 antibodies (non-absorbed, n=2; absorbed, n=5). Although the number of individuals in both positive and negative controls remain constant, protein rFULL antigen exhibited discrepancies compared to the results obtained for the protein mixture. Regarding IgG reactivity there were some false positive results (absorbed, n=13; non-absorbed, n=17), while for IgG4 the result revealed a less false positive results (absorbed, n=11; non-absorbed, n=11). In addition, the use of rFULL as antigen exhibited higher rates of false negatives, when IgG was used the non-absorbed sera showed more false negative results (n=15) compared to absorbed sera (n=9), but when IgG4 was applied the non-absorbed sera exhibited less false negative results (n=14), while absorbed sera showed 17 false negative results (Figure 3 A-D). There were no statistical differences observed between the results from absorbed and non-absorbed sera.

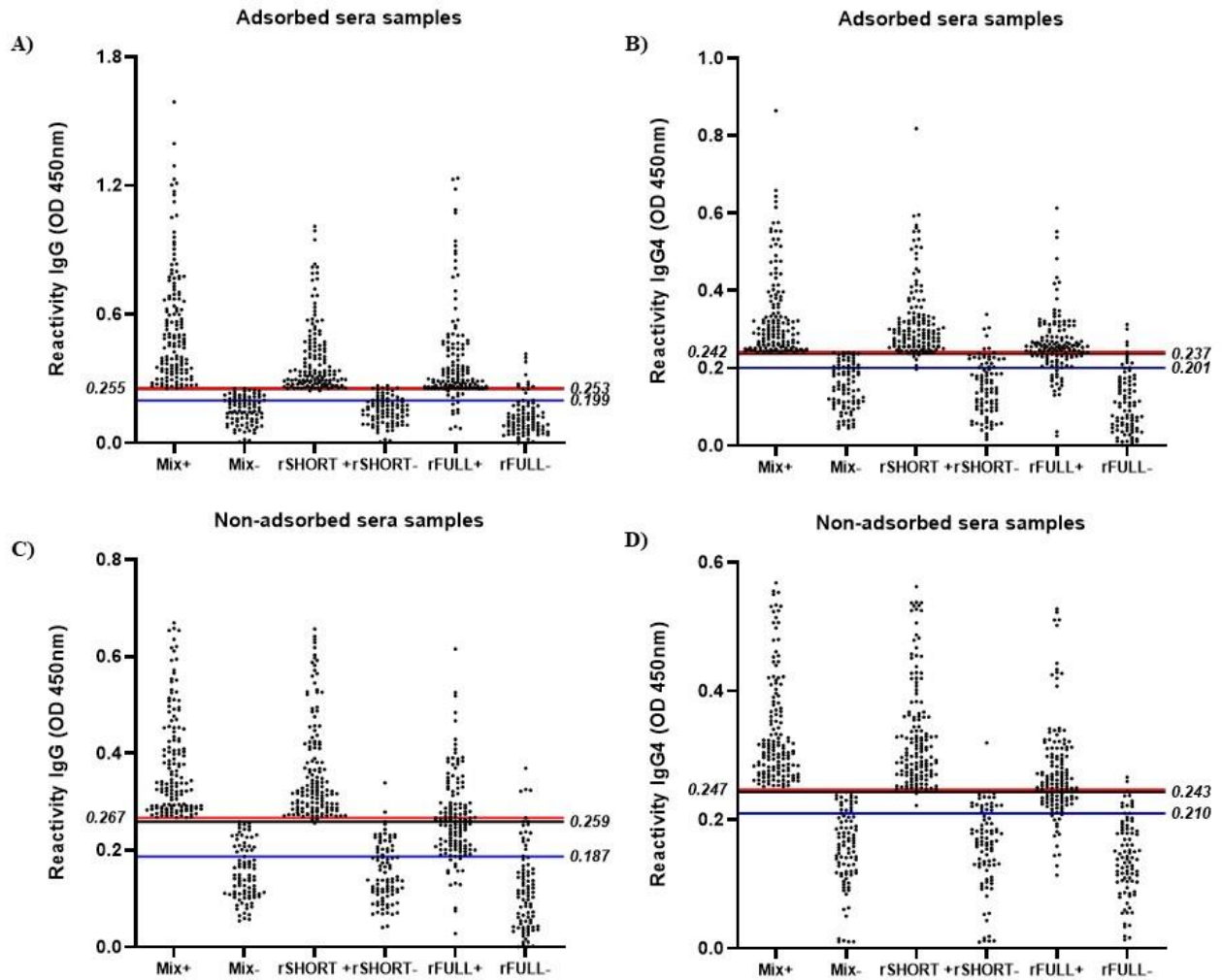


Figure 3. Comparison of reactivities of IgG and IgG4 antibodies against the mix of rTES26 and rCTL-4-ELISA and ELISA with rSHORT and rFULL chimeric antigens using adsorbed and non-adsorbed sera. A) Reactivity of IgG antibodies against recombinant proteins in adsorbed sera. Cut-offs: Red line- Mix of proteins= 0.255; Black line- rSHORT= 0.253; and Blue line- rFULL= 0.199. B) Reactivity of IgG4 antibodies against recombinant proteins in adsorbed sera. Cut-offs: Red line- Mix of proteins= 0.242; Black line- rSHORT= 0.237; and Blue line- rFULL= 0.201. C) Reactivity of IgG antibodies against recombinant proteins in non-adsorbed sera. Cut-offs: Red line- Mix of proteins= 0.267; Black line- rSHORT= 0.259; and Blue line- rFULL= 0.187. D) Reactivity of IgG4 antibodies against recombinant proteins in non-adsorbed sera. Cut-offs: Red line- Mix of proteins= 0.247; Black line- rSHORT= 0.243; and Blue line- rFULL= 0.210.

## 4 - Discussion

The underreporting of human toxocariasis (HT) prevalence worldwide has been noted (Macpherson, 2013). Diagnosis of HT primarily depends on clinical symptoms and serological testing, which are fraught with numerous diagnostic challenges (Ma et al. 2020). Currently, *Toxocara* spp. excreted-secreted-ELISA (TES-ELISA) stands as the gold standard for HT immunodiagnosis (Olave et al. 2016). However, the humoral immune response triggered by TES antigen is largely due to six conserved cysteine domains present in various proteins of the TES protein complex (TES-120, TES-26, TES-32, and TES-70), as identified (Gems et al. 1995; Loukas and Procriv, 2001). The conserved cysteine domains in TES antigens have been recognized for their cross-reactivity with other helminths and even house dust mites, contributing to inaccurate HT diagnoses (Da Silva et al. 2022). Given these challenges, immunodiagnosics that use recombinant antigens are emerging as the leading method for precise HT diagnosis. Supporting this view, our team has assessed two recombinant proteins of *T. canis* from the excreted-secreted antigens (TES-26 and CTL4), which showed superior sensitivity and specificity (100% for both) over native TES (Da Silva et al. 2022).

Despite their benefits, producing two separate recombinant proteins is generally expensive and labor-intensive (Demay et al. 2023; Eskandari et al. 2023). As an alternative, creating chimeric recombinant proteins offers a cost-effective, less laborious solution with similar efficacy, including enhanced sensitivity, specificity, and versatility. By merging different antigenic domains, chimeric proteins can induce a stronger and more specific immune response, aiding in the more efficient detection of biomarkers (Zhan et al. 2015). Building on prior research and seeking to improve the immunodiagnostic approach, we introduce a novel chimeric protein based on B-cell epitopes as an alternative to the combined use of TES-26 and CTL4 recombinant antigens for HT diagnosis via indirect ELISA.

Several studies suggest that recombinant proteins featuring the optimal alignment of available B-cell epitopes offer enhanced functional performance in the accuracy of immunodiagnostic tests (Anderson et al. 2015; Santos et al. 2016; Santos et al. 2018). Nonetheless, in our investigation, the rSHORT chimeric protein, which

incorporates only epitopes with the highest antigenicity scores (7 epitopes), outperformed the rFULL chimeric protein in reactivity. The latter was engineered to include the broadest array of epitopes scored from 0.70 to 1 (14 epitopes). In direct comparisons, dot blot analysis showed that rSHORT's reactivity closely matched that of the original proteins when IgG was used as the detecting antibody. On the other hand, rFULL demonstrated less reactivity compared to its counterparts, an outcome potentially attributable to its greater mass (38 kDa). This size difference may affect protein folding and obscure critical epitopes, particularly those with the highest antigenicity scores (Wang et al. 2011). Additionally, IgG4 antibodies can also be employed in dot blot or immunoblotting assays to measure reactivity.

The attempt to diminish the cross-reactivity between antibodies production against other organisms is relevant to eliminate imprecise diagnostics of toxocariasis. Prior studies have compared the sensitivity and specificity of recombinant proteins toward native-TES (Chieffi et al. 2021). Despite observing a decline in sensitivity with the use of recombinant antigens, studies reported superior specificity compared to native TES, which leveraged insights into cross-reactivity decreasing (Santos et al. 2018; Zahabiun et al. 2015). Moreover, chimeric recombinant fusion proteins built from TES-26, TES-32, TES-120, and myosin heavy chain showed a higher specificity and lesser cross-reaction than native-TES (Mesa-Arango et al. 2022), besides to use others epitopes combination as chimeric proteins our study distinguish from previous study by evaluating the influence of cross-reactivity with *Ascaris lumbricoides* on toxocariasis diagnostic in both adsorbed and non-adsorbed sera samples . Aiming to compare our findings with those achieved in the study conducted by Da Silva and collaborators (Da Silva et al. 2022), we performed indirect ELISA using both IgG and IgG4 antibodies. Similar reactivities were observed in both sera and antibodies, supporting the hypothesis that recombinant proteins employed as antigens, decrease the chances of cross-reactivity, providing an enhanced diagnostic accuracy of helminthiasis (Mesa-Arango et al. 2022; Wickramasinghe et al. 2008).

In the antibodies context, IgG is the most used antibody in the immunodiagnostic of helminthiasis (Rudzinska et al. 2017). However, as documented the IgG4 production

may indicate an ongoing infection (Ma et al. 2018). Overall, both Dot Blot and indirect ELISA using IgG against recombinant antigens demonstrated similar reactivity results between the mix of proteins (rTES-26 and rCTL-4) and the rSHORT. The IgG4 was not employed in Dot Blot assay, which need more validation regarding its reactivity toward recombinant antigens. Although rSHORT presented similar results compared to mix of proteins, adsorbed sera have presented greater false-negative results than in non-adsorbed sera for both antibodies, besides to exhibit better results in terms of reactivity, sensitivity and specificity. Contrarily, the rFULL protein exhibited inferior antigenic performance in ELISA assay, hence in higher false-negative cases compared to the outcomes observed in rSHORT for both IgG and IgG4 antibodies. False negatives may have more severe consequences than false positives due to false negatives can lead to the omission of appropriate treatment and the underreporting of newly cases of infection (Hulme et al. 2023; Zhang et al. 2022).

In conclusion, despite its lower molecular weight, the rSHORT protein played a comparable role towards its original proteins (TES-26 and CTL-4), suggesting its potential use as an alternative antigen in the immunodiagnosis of human toxocariasis. The development of chimeric recombinant antigens represents a functional tool for enhancing diagnostic tests, particularly for helminth infections. Besides, their lower cost of production and lesser time consuming, these antigens contribute to improve the test accuracy, leading to enhanced performance in terms of sensitivity and specificity. Although, both rSHORT and rFULL have been evaluated through serological tests using adsorbed and non-adsorbed sera by ELISA, these findings require validation in individuals with confirmed clinical forms of toxocariasis.

### **Ethics approval and consent to participate**

Ethical approvals were obtained from the Ethics Committee of the Maternidade Climatério de Oliveira of Bahia/Federal University of Bahia (MCOB / UFBA), CONEP 15782 - n° 25000.013834/2010-96, as part of a project nominated “Risk factors, biomarkers and endophenotypes of severe asthma”. Written informed consent was obtained from each subject.



### **Consent for publication**

All authors agreed to publish. There was no controversy.

### **Data availability**

Data will be made available on request.

### **Funding**

This study was funded by Brazilian agencies: UNIVERSAL/CNPQ, CAPES and FAPESB.

### **CRedit authorship contribution statement**

**RCS:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **VLMM:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **AMSF:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **ESS:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **COMFJ:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Visualization. **AAC:** Resources, Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **NGMC:** Methodology, Formal analysis, Writing - review & editing. **NMAN:** Project administration, Funding acquisition, Resources. **CSP:** Project administration, Funding acquisition, Resources, Investigation, Methodology, Writing - review & editing.

### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### **Acknowledgement**

We are thankful to Brazilian agencies for supporting this study. We are grateful to all individuals who contributed to this work.

## S1-Supplementary Material

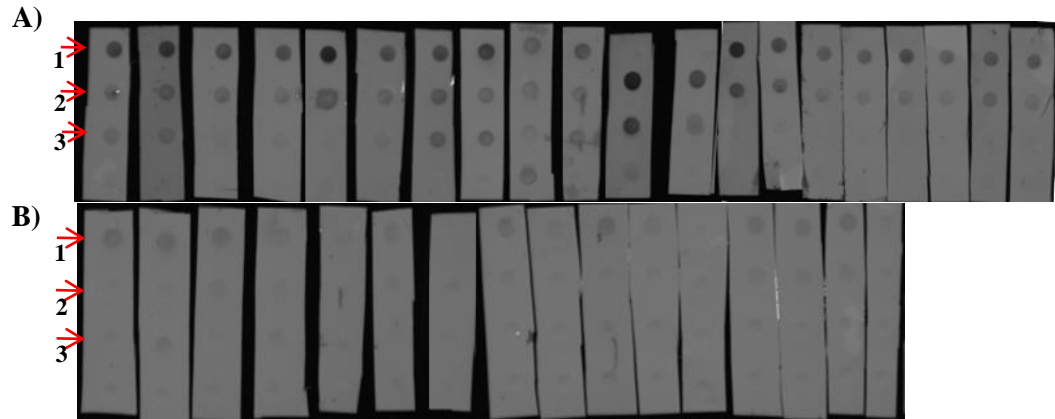


Figure 4. Dot Blot to assess the recombinant proteins reactivity in positives and negatives tested sera by indirect ELISA. A) 20 positive sera separated for strip (Line 1- shows the reactivity to the combination of rTES26 and rCTL-4 proteins; Line 2- shows the reactivity to rSHORT protein; Line 3- shows the reactivity to rFULL. B) 16 negative sera separated for strip (Line 1- shows the reactivity to the combination of rTES26 and rCTL-4 proteins; Line 2- shows the reactivity to rSHORT protein; Line 3- shows the reactivity to rFULL). All recombinant proteins, including the combined rTES26 and rCTL-4 proteins were placed in 4.5  $\mu\text{g}/\text{Dot}$ .

## References

- Abbaszadeh Afshar, M.J., Zahabiun, F., Heydarian, P., Mozafar Saadati, H., Mohtasebi, S., Khodamoradi, F., Raissi, V., 2020. A Systematic Review and Meta-analysis of Toxocariasis in Iran: Is it Time to Take it Seriously? *Acta parasitologica* 65, 569-584.
- Alcantara-Neves, N.M., dos Santos, A.B., Mendonca, L.R., Figueiredo, C.A., Pontes-de-Carvalho, L., 2008. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. *Experimental parasitology* 119, 349-351.
- Anderson, J.P., Rascoe, L.N., Levert, K., Chastain, H.M., Reed, M.S., Rivera, H.N., McAuliffe, I., Zhan, B., Wiegand, R.E., Hotez, P.J., Wilkins, P.P., Pohl, J., Handali, S., 2015. Development of a Luminex Bead Based Assay for Diagnosis of Toxocariasis Using Recombinant Antigens Tc-CTL-1 and Tc-TES-26. *PLoS neglected tropical diseases* 9, e0004168.
- Baharudeen, Z., Noordin, R., Soon, L.T., Balachandra, D., Anuar, N.S., Mustafa, F.H., Rahumatullah, A., 2022. Isolation and Production of Human Monoclonal Antibody Proteins against a *Toxocara canis* Excretory-Secretory Recombinant Antigen. *Pathogens* 11.
- Caballero-Garcia, M.D.L., Simon-Salvador, J., Hernandez-Aguilar, J.C., Reyes-Lopez, A., Noguera-Torres, B., Jimenez-Cardoso, E., 2019. Frequency of *Toxocara canis* antibodies in Mexican paediatric patients with epilepsy. *Journal of helminthology* 94, e89.
- Castro, M., Corren, J., Pavord, I.D., Maspero, J., Wenzel, S., Rabe, K.F., Busse, W.W., Ford, L., Sher, L., FitzGerald, J.M., Katelaris, C., Tohda, Y., Zhang, B., Staudinger, H., Pirozzi, G., Amin, N., Ruddy, M., Akinlade, B., Khan, A., Chao, J., Martincova, R., Graham, N.M.H., Hamilton, J.D., Swanson, B.N., Stahl, N., Yancopoulos, G.D., Teper, A., 2018. Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med* 378, 2486-2496.
- Chieffi, P.P., Zevallos Lescano, S.A., Rodrigues, E.F.G., Dos Santos, S.V., 2021. Human Toxocariasis: 2010 to 2020 Contributions from Brazilian Researchers. *Research and reports in tropical medicine* 12, 81-91.
- da Silva, M.B., Fernandes, A.M.S., da Silva, E.S., Urrego, J.R., Santiago, L.F., Garces, L.F.S., Portela, R.D., Pacheco, L.G.C., Briza, P., Ferreira, F., Pinheiro, C.S., Alcantara-Neves, N.M., 2022. Proteomics and immunoblotting analyses reveal antigens that optimize the immunodiagnosis of the infection by *Toxocara* spp. *Transboundary and emerging diseases* 69, e2994-e3006.
- Demay, F., Hallier, M., Georgeault, S., Com, E., Cattoir, V., Goude, R., Gillet, R., 2023. Simple purification and characterization of soluble and homogenous ABC-F translation factors from *Enterococcus faecium*. *Protein expression and purification* 210, 106325.

Dietrich, C.F., Cretu, C., Dong, Y., 2020. Imaging of toxocariasis. *Advances in parasitology* 109, 165-187.

Eskandari, A., Nezhad, N.G., Leow, T.C., Rahman, M.B.A., Oslan, S.N., 2023. Current achievements, strategies, obstacles, and overcoming the challenges of the protein engineering in *Pichia pastoris* expression system. *World journal of microbiology & biotechnology* 40, 39.

Fillaux, J., Magnaval, J.F., 2013. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary parasitology* 193, 327-336.

Francalanci, E., Manciuilli, T., Bandini, G., Blanc, P., Bonelli, S.I., Brunetti, E., Gotuzzo, E., Cretu, C.M., Gobbi, F., Bartoloni, A., Zammarchi, L., 2023. Visceral larva Migrants in a Young Italian Patient: A Diagnostic Dilemma. *Acta parasitologica* 68, 937-941.

Gems, D., Ferguson, C.J., Robertson, B.D., Nieves, R., Page, A.P., Blaxter, M.L., Maizels, R.M., 1995. An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 270, 18517-18522.

Hotez, P.J., Wilkins, P.P., 2009. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? *PLoS neglected tropical diseases* 3, e400.

Hulme, K., Werno, A., White, K., Spark, A., 2023. A ruptured thoracic aortic aneurysm and the difficulties of confirming syphilis. *Forensic science, medicine, and pathology* 19, 215-220.

Krasny, J., Sach, J., 2023. Forms of Ocular Larval Toxocariasis in Childhood. A Review. *Ceska a slovenska oftalmologie : casopis Ceske oftalmologicke spolecnosti a Slovenske oftalmologicke spolecnosti* 79, 59-67.

Lee, Y., Song, Y.S., Phi, J.H., Kim, I.O., Kim, K., 2023. A case report of spinal toxocariasis with extensive tumor-like involvement. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 39, 811-814.

Loukas, A., Prociw, P., 2001. Immune responses in hookworm infections. *Clinical microbiology reviews* 14, 689-703, table of contents.

Ma, G., Holland, C.V., Wang, T., Hofmann, A., Fan, C.K., Maizels, R.M., Hotez, P.J., Gasser, R.B., 2018. Human toxocariasis. *The Lancet. Infectious diseases* 18, e14-e24.  
Ma, G., Rostami, A., Wang, T., Hofmann, A., Hotez, P.J., Gasser, R.B., 2020. Global and regional seroprevalence estimates for human toxocariasis: A call for action. *Advances in parasitology* 109, 275-290.

Macpherson, C.N., 2013. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *International journal for parasitology* 43, 999-1008.

Mendonca, L.R., Veiga, R.V., Dattoli, V.C., Figueiredo, C.A., Fiaccone, R., Santos, J., Cruz, A.A., Rodrigues, L.C., Cooper, P.J., Pontes-de-Carvalho, L.C., Barreto, M.L., Alcantara-Neves, N.M., 2012. *Toxocara* seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban Latin American. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1886.

Mengarda, A.C., Silva, T.C., Silva, A.S., Roquini, D.B., Fernandes, J.P.S., de Moraes, J., 2023. Toward anthelmintic drug candidates for toxocariasis: Challenges and recent developments. *European journal of medicinal chemistry* 251, 115268.

Mesa-Arango, J.A., Olave-Velandia, A.M., Garcia-Montoya, G.M., Isaza-Agudelo, J.P., Jimenez-Ruiz, A., Alzate, J.F., 2022. Evaluation of new *Toxocara canis* chimeric antigens as an alternative to conventional TES-Ag for anti-*Toxocara* antibodies detection. *Heliyon* 8, e11144.

Munoz-Guzman, M.A., del Rio-Navarro, B.E., Valdivia-Anda, G., Alba-Hurtado, F., 2010. The increase in seroprevalence to *Toxocara canis* in asthmatic children is related to cross-reaction with *Ascaris suum* antigens. *Allergologia et immunopathologia* 38, 115-121.

Noordin, R., Yunus, M.H., Tan Farrizam, S.N., Arifin, N., 2020. Serodiagnostic methods for diagnosing larval toxocariasis. *Advances in parasitology* 109, 131-152.

Olave, A.M., Mesa, J.A., Botero, J.H., Patino, E.B., Garcia, G.M., Alzate, J.F., 2016. Production and evaluation of the recombinant antigen TES-30 of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of toxocariasis. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud* 36, 39-51.

Pouryousef, A., Sarkari, B., Mootabi Alavi, A., Omidian, M., Mikaeili, F., 2023. Deglycosylation of Excretory-Secretory Antigens of the Second-Stage Larvae of *Toxocara cati* Improves Its Efficacy in the Diagnosis of Human Toxocariasis. *Journal of tropical medicine* 2023, 3024063.

Rostami, A., Riahi, S.M., Holland, C.V., Taghipour, A., Khalili-Fomeshi, M., Fakhri, Y., Omrani, V.F., Hotez, P.J., Gasser, R.B., 2019. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases* 13, e0007809.

Rudzinska, M., Kowalewska, B., Sikorska, K., 2017. Clinical usefulness of Western blotting and ELISA avidity for the diagnosis of human toxocariasis. *Parasite immunology* 39.

Santarem, V.A., Panazzolo, G.K., Kmetiuk, L.B., Domingues, O.J., Ferreira, I.B., de Souza Filho, R.T., Farinhas, J.H., Doline, F.R., Lescano, S.A.Z., Biondo, L.M., Giuffrida, R., Biondo, A.W., Favero, G.M., 2023. One health approach to toxocariasis in quilombola communities of southern Brazil. *Parasites & vectors* 16, 379.

Santos, F.L., Celedon, P.A., Zanchin, N.I., Brasil Tde, A., Foti, L., Souza, W.V., Silva, E.D., Gomes Yde, M., Krieger, M.A., 2016. Performance Assessment of Four Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens Based on Antigen-Antibody Detection for Diagnosis of Chronic Chagas Disease. *PloS one* 11, e0161100.

Santos, L.M.D., Magalhaes, C.G., Telmo, P.L., Cerqueira, M.P., Donassolo, R.A., Leite, F.P.L., Elefant, G.R., Avila, L., Scaini, C.J., Moreira, A.N., Conceicao, F.R., 2018. Sensitivity and specificity of recombinant proteins in *Toxocara* spp. for serodiagnosis in humans: Differences in adult and child populations. *PloS one* 13, e0208991.

Skulinova, K., Novak, J., Kolarova, L., Kasny, M., 2022. Antigenic Proteins from the Excretory-Secretory Products of *Toxocara canis* Larvae and Evaluation of Their Potential for Immunodiagnosics of Larval Toxocarosis. *Acta parasitologica* 67, 705-713.

Varghese, A., Raina, O.K., Chandra, D., Mirdha, B.R., Kelawala, N.H., Solanki, J.B., Kumar, N., Ravindran, R., Arun, A., Rialch, A., Lalrinkima, H., Kelawala, R.N., Samanta, S., 2017. Sero-detection of *Toxocara canis* infection in human with T.canis recombinant arginine kinase, cathepsin L-1 and TES-26 antigens. *Acta parasitologica* 62, 775-778.

Wang, J., Lin, Y., Cai, P., Wang, H., 2011. Effects of vector fusion peptides on the conformation and immune reactivity of epitope-shuffled, recombinant multi-epitope antigens. *Protein and peptide letters* 18, 73-83.

Wickramasinghe, S., Yatawara, L., Nagataki, M., Takamoto, M., Watanabe, Y., Rajapakse, R.P., Uda, K., Suzuki, T., Agatsuma, T., 2008. Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model. *Parasitology research* 103, 853-858.

Yamasaki, H., Araki, K., Lim, P.K., Zasmy, N., Mak, J.W., Taib, R., Aoki, T., 2000. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *Journal of clinical microbiology* 38, 1409-1413.

Zahabiun, F., Sadjjadi, S.M., Yunus, M.H., Rahumatullah, A., Moghaddam, M.H., Saidin, S., Noordin, R., 2015. Production of *Toxocara cati* TES-120 Recombinant Antigen and Comparison with its *T. canis* Homolog for Serodiagnosis of Toxocariasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 93, 319-325.

Zhan, B., Ajmera, R., Geiger, S.M., Goncalves, M.T., Liu, Z., Wei, J., Wilkins, P.P., Fujiwara, R., Gazzinelli-Guimaraes, P.H., Bottazzi, M.E., Hotez, P., 2015. Identification of immunodominant antigens for the laboratory diagnosis of toxocariasis. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 20, 1787-1796.

Zhang, Y.L., Jiang, T.T., Ji, P.H., He, Z.Q., Chen, X., Hong, Y., Zhao, D.Y., Deng, Y., Chen, W.Q., Zhang, H.W., 2022. [Evaluation of efficiency of different anti-cysticercus antibody test kits for serodiagnosis of cysticercosis]. *Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi = Chinese journal of schistosomiasis control* 34, 36-40.

### **7. CAPÍTULO 3 – PATENTE A SER SUBMETIDA AO NIT/UFBA INTITULADA:**

Melhoramento do método de imunodiagnóstico da toxocaríase humana utilizando proteínas recombinantes quiméricas denominadas rSHORT e rFULL, baseadas em epítopos de células B das moléculas parentais TES-26 e CTL-4



**Inventores:** Carina Silva Pinheiro, Raphael Chagas Silva, Neuza Maria Alcântara Neves, Luís Gustavo Carvalho Pacheco.

## RESUMO

Patente de invenção: “MELHORAMENTO DO MÉTODO DE IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARIÁSE HUMANA UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES QUIMÉRICAS DENOMINADAS rSHORT E rFULL, BASEADAS EM EPÍTOPOS DE CÉLULAS B DAS MOLÉCULAS PARENTAIS TES-26 E CTL-4”

A invenção trata-se de um processo de produção de proteínas recombinantes quiméricas denominadas rSHORT e rFULL, que são derivadas de proteínas nativas presentes no excretado-secretado do *Toxocara* spp. (TES-26 e CTL-4), e método de aplicação destas proteínas em ensaios de imunodiagnóstico da toxocaríase com aplicação na área de biotecnologia e imunodiagnóstico visando a utilização de proteínas quiméricas recombinantes específicas do parasito, que não apenas aprimoram a eficácia do diagnóstico, oferecendo maior discriminação entre resultados positivos e negativos, mas também contribuem para a redução significativa dos custos e o tempo de produção em larga escala dessas proteínas.

## RELATÓRIO DESCRITIVO

[01] A presente invenção descreve o processo de produção de proteínas recombinantes quiméricas denominadas rSHORT e rFULL, que são derivadas de proteínas nativas presentes no excretado-secretado do *Toxocara* spp. (TES-26 e CTL-4), e método de aplicação destas proteínas em ensaios de imunodiagnóstico da toxocaríase.

[02] Trate-se de uma construção in silico de duas proteínas quiméricas baseadas em epítopos de células B das proteínas nativas do *Toxocara* spp., TES-26 e CTL-4 utilizando diferentes sequências com scores antigênicos distintos.

[03] O novo método proposto permite a detecção de anticorpos contra antígenos de *Toxocara canis*, apresentando uma alta especificidade e sensibilidade, baixo custo e precisão. Além de não haver a necessidade de adsorção de soros com antígeno somático de *Ascaris lumbricoides*. Permitindo assim, uma maior discriminação entre resultados positivos e negativos, minimizando os resultados falso-negativos e falso-positivos.

[04] O gênero *Toxocara* spp., é constituído por 21 espécies de nematódeos gastrointestinais responsáveis pelo desenvolvimento da toxocaríase em canídeos e felídeos, sejam eles domésticos ou selvagens (MAZUR- MELEWSKA, K.; MANIA A.; FIGLEROWICZ, M.; KEMNITZ, P.; SŁUŻEWSKI, W. e MICHALAK, M. The influence of age on a clinical presentation of *Toxocara* spp. infection in children. Ann Agric Environ Med, 2012). As espécies *T. canis* e *T. cati* infectam cães e gatos, os quais liberam seus ovos no ambiente através das fezes e quando ingeridos acidentalmente pelos humanos levam ao desenvolvimento da toxocaríase humana (STRUBE, C.; HEUER, L.; JANECEK, E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. Vet Parasitol, 2012). Embora sejam encontrados mundialmente, a incidência de toxocaríase é relatada principalmente em regiões tropicais com baixos níveis socioeconômicos (AHN, S.J.; RYOO, N.K.; WOO, S.J. Ocular toxocarosis: clinical features, diagnosis, treatment, and prevention. Asia Pac Allergy, 2014).

[05] O homem é um dos hospedeiros paratênicos do *Toxocara* spp., logo, o parasito permanece no corpo do hospedeiro e não consegue completar seu ciclo de vida (STRUBE, C.; HEUER, L.; JANECEK, E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. Vet Parasitol, 2012). Desse modo, as larvas que atingem a corrente sanguínea e conseqüentemente algum órgão, dependendo da localização podem promover alterações necróticas e hemorrágicas (THOMPSON, R.C.A. Parasite zoonoses and wildlife: one health, spill over and human activity. Int J Parasitol, 2013).

[06] A toxocaríase humana é subdividida em síndrome da larva migrans visceral (LMV), porém existem larvas que migram diretamente para o globo ocular, ocasionando a síndrome da larva migrans ocular (LMO) (FILLAUX, J.; J.-F. MAGNAVAL. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. Veterinary Parasitology, 2013). Dependendo da localização das larvas e desenvolvimento dos sintomas clínicos a toxocaríase ainda pode ser dividida em toxocaríase clássica, assintomática, oculta e compartimentalizada (ocular e neurológica) (PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. J Helminthol, 2001).

[07] A exposição do hospedeiro a larva do parasito produz uma reação inflamatória caracterizada por uma resposta imune inata e adaptativa. Inicia-se com o reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados a agentes patogênicos) por células dendríticas, que por sua vez processará e apresentará os peptídeos via moléculas MHC de classe II aos linfócitos T naive (HEWITSON, J.P.; GRAINGER, J.R.; MAIZELS, R.M. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. Mol Biochem Parasitol, 2009).

[08] As larvas infectantes de *Toxocara* spp., modulam a resposta imunológica do hospedeiro para um perfil Th2, tanto das células da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa, culminando na produção de citocinas proinflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-13), assim, há um aumento dos níveis de eosinófilos e um aumento da produção de IgE pelas células plasmocitóides (CARVALHO, E.A.A.; ROCHA, R.L. Toxocarosis: visceral larva migrans in children. J Pediatr, 2011). Como estratégia de burlar o sistema

imune, esses nematóides desenvolveram mecanismos de defesa contra a resposta imunológica induzindo a produção de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  pelas células T regulatórias, ocasionando a não eliminação destes helmintos do organismo (PLATTSMILLS, T.A.; BLUMENTHAL, K.; PERZANOWSKI, M.; WOODFOLK, J.A. Determinants of clinical allergic disease. The relevance of indoor allergens to the increase in asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med, 2000).

[09] A manifestação da infecção é altamente pleomórfica e varia de formas assintomáticas a letais. Sua gravidade dependerá da carga parasitária e da resposta imune do hospedeiro contra o parasito (OVERGAAUW, P.A., VAN KNAPEN, F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp., Vet Parasitol, 2013). Baixas condições socioeconômicas e baixo controle de zoonose contribuem para alta prevalência de infecções pelos parasitos. Alguns estudos desenvolvidos ao redor do mundo demonstraram que a prevalência da toxocaríase pode variar dentro de regiões do próprio país (CHIDUMAYO, N.N. Prevalence of *Toxocara* in dogs and cats in Africa. Adv Parasitol, 2020). As crianças são as mais afetadas por essa infecção, e o comportamento de geofagia, falta de higiene e contato com animais de estimação são fatores de risco para o aumento da exposição e taxas de infecção (GAVIGNET, B.; PIARROUX, R.; AUBIN, F.; MILLON, L.; HUMBERT, P. Cutaneous manifestations of human toxocariasis. J Am Acad Dermatol, 2008). Devido às dificuldades associadas ao diagnóstico e à alta prevalência de casos assintomáticos, essa infecção permanece altamente negligenciada; no entanto, estudos recentes mostraram altas taxas de soropositividade para *Toxocara canis* em diferentes regiões (SILVA, M.B.; AMOR, A.L.M.; SANTOS, L.N.; GALVÃO, A.A.; OVIEDO, V. A.V.; SILVA, E.S.; BARBOSA, C.G.; GONÇALVES, M.S.; COOPER, P.J.; FIGUEIREDO, C.A.; RIBEIRO, R.C.; ALCÂNTARA-NEVES, N.M. Risk factors for *Toxocara* spp. seroprevalence and its association with atopy and asthma phenotypes in school-age children in a small town and semi-rural áreas of Northeast Brazil. Acta Trop, 2016).

[10] O diagnóstico da toxocaríase não é passível de ser feito apenas com base no quadro clínico do paciente, uma vez que, muitos dos infectados são assintomáticos

(MOREIRA, G.M.; TELMO, P.D.E. L.; MENDONCA, M.; MOREIRA, A.N.; MCBRIDE, A.J.; SCAINI, C.J. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. Trends Parasitol, 2014), além disso, o parasito pode causar danos a vários órgãos ampliando o espectro sintomatológico que pode ser confundido com outras doenças. O diagnóstico sorológico utilizando os anticorpos IgG contra o antígeno excretado-secretado do *Toxocara* spp., (TES) através de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), trouxe avanços no imunodiagnóstico da toxocaríase humana (MAGNAVAL, J.F.; GLICKMAN, L.T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. The Korean Journal of Parasitology, 2001). Porém, esta técnica tem uma baixa sensibilidade e baixa especificidade (DE SAVIGNY, D.H.; TIZARD, I.R. *Toxocara* larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1977), a produção in house é complexa e requer o cultivo das larvas por no mínimo três meses para obter uma concentração satisfatória de antígeno larval (ALCANTARA-NEVES, N.M.; SANTOS, A.B.; MENDONCA, L.R.; FIGUEIREDO, C.A.V.; CARVALHO, L.C.P. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis*. Experimental Parasitology 119: p. 349-351, 2008). Outra desvantagem é que para a sua utilização os soros precisam ser adsorvidos previamente para eliminar a reatividade cruzada entre *Toxocara* spp. e *Ascaris lumbricoides*, pois em áreas de clima tropical e condições sanitárias baixas esta coinfeção é frequente (MENDONÇA, L.R.; VEIGA, R.V.; DATTOLI, V.C.C.; FIGUEIREDO, C.A.; FIACCONE, R. *Toxocara* Seropositivity, Atopy and Wheezing in Children Living in Poor Neighbourhoods in Urban Latin American. PLoS Negl Trop Dis, 2012).

[11] Para suprir a necessidade de testes de imunodiagnóstico mais precisos e menos laboriosos, a produção e utilização de proteínas recombinantes produzidas a partir de antígenos larvares do *Toxocara* spp. tem demonstrado resultados satisfatórios (GASSER, R.B. Molecular tools - advances, opportunities and prospects. Vet Parasitol, 2006). O estudo mais recente publicado pelo nosso grupo, avaliando o potencial antigênico das proteínas recombinantes MUC-3, TES-26, CTL-4 e TES-32 por meio da técnica de ELISA indireto e encontrou valores de sensibilidade entre 91.7% a 97.3% e

especificidade de 94.0% a 97.9% utilizando IgG como anticorpo, já quando utilizou IgG4 como anticorpo encontrou resultados de sensibilidade de 88.8% a 98.3% e especificidade de 97.8% a 97.9%. Avaliando as moléculas rTES-26 e rCTL-4 combinadas os resultados foram ainda melhores, alcançando 100% de sensibilidade e especificidade utilizando o anticorpo IgG4 (DA SILVA, M.B.; FERNANDES, A.M.S.; DA SILVA, E.S.; URREGO, J.R.; SANTIAGO, L.F.; GARCES, L.F.S.; PORTELA, R.D.; PACHECO, L.G.C.; BRIZA, P.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, C.S.; ALCANTARA-NEVES, N.M. Proteomics and immunoblotting analyses reveal antigens that optimize the immunodiagnosis of the infection by *Toxocara* spp. *Transboundary and emerging diseases*, 2022).

[12] Como o parasito não consegue chegar à fase reprodutiva no ser humano, ovos não são liberados pelas fezes e não é possível de ser encontrado em exames diretos, como o parasitológico, por exemplo. Alguns métodos utilizados para confirmação da infecção são: a tomografia computadorizada, a análise histopatológica e imunohistoquímica com anticorpos policlonais, porém as desvantagens dessas técnicas é que além de ser um procedimento invasivo, cara e de difícil execução, existe uma dificuldade na identificação das larvas devido ao tamanho muito reduzido (FICA, A.; JERCIC, M.I.; NAVARRETE, C. Brain lesions associated with eosinophilia. A useful clue for neurotoxocariasis. Report of one case. *Rev Med Chil*, 2021). Com isso, o diagnóstico de toxocaríase é feito principalmente através de métodos sorológicos, em combinação com o quadro clínico (DE SAVIGNY, D.H.; TIZARD, I.R. *Toxocara* larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1977).

[13] Um dos testes sorológicos utilizados é o Western Blot, que elimina a possibilidade de um resultado falso-positivo, por se basear na identificação de um padrão de bandas protéicas que permite diferenciar o parasito de outros helmintos. Este método mostra uma diferença significativa, diminuindo a reatividade cruzada com outros helmintos e aumentando a sensibilidade e especificidade do teste, no entanto é um método caro e por isso não acessível a todos (MACPHERSON, C. N. *The epidemiology and public*

health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. Int J Parasitol, 2013).

[14] O diagnóstico de toxocaríase é feita através de métodos sorológicos, como por exemplo, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), usando anticorpos específicos contra antígenos produzidos por *Toxocara* spp., principalmente o anticorpo IgG (imunoglobulina G) que é produzido pela indução do antígeno excretado/secretado (TES) do nematóide, porém a existência da reatividade cruzada com anticorpos IgG produzidos por outros helmintos dificultam a precisão do teste (AMARAL, H.L.C.; RASSIER, G.L.; PEPE, M.S. Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: a risk factor for visceral larva migrans. Vet. Parasitol, 2010; SANDRA GUADALUPE, B.G.; MARIO NOÉ, M.G.; GUSTAVO ESTEBAN, P.A.; NORMA YVETT, G.B.; KARINA, C.S.; ALMA LETICIA, C.Z.; ALAN EDUARDO, H.S.; JOSÉ GUADALUPE, H.L.; ÁLVARO, P.M.; ALEJANDRO GABRIEL, G.G.; MARTHA, P.M. Detection of antigens and anti-*Toxocara canis* antibodies in children with different asthma severities. Immun Inflamm Dis, 2021). Essa reatividade cruzada afeta a sensibilidade e especificidade do teste, prejudicando o diagnóstico correto da infecção (GRUNTMEIR, J.M.; THOMPSON, N.M.; LONG, M.T.; BLAGBURN, B.L.; WALDEN, H.D.S. Detection of heart worm antigen without cross-reactivity to helminths and protozoa following heat treatment of canine serum. Parasit Vectors, 2021).

[15] Outro anticorpo utilizado no diagnóstico de infecção por *Toxocara* spp., é o IgG4 (imunoglobulina G, subclasse 4) que é usado também no diagnóstico de outras parasitoses. O uso de anticorpos IgG4 para diagnóstico de parasitoses vem sendo discutido em alguns estudos com relação a sua capacidade de diagnosticar a infecção em suas fases, por exemplo, alguns estudos demonstraram que a IgG4 é capaz de dar um diagnóstico mais efetivo se a infecção estiver em sua fase tardia ou crônica, enquanto outros afirmam que o diagnóstico feito utilizando IgG4 não permite um diagnóstico preciso e que por muitas vezes é necessária a utilização de outro diagnóstico utilizando IgG para a confirmação da infecção (LACHAUD, L. O.; CALAS, M.C.; PICOT, S.; ALBABA, N.; BOURGEOIS, F. Pratloug Value of 2 IgG avidity

commercial tests used alone or in association to date toxoplasmosis contamination Diagn. Microbiol. Infect. Dis, 2009; NOORDIN, R.; SMITH, H.V.; MOHAMAD, S.; MAIZELS, R.M.; FONG, M.Y. Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. Acta Trop, 2005)

[16] Embora o teste ELISA tenha trazido avanços no imunodiagnóstico da toxocaríase, o uso de antígenos nativos, como por exemplo, antígenos excretados-secretados pela larva do *Toxocara* spp., aumentam as chances de reatividade cruzada, principalmente em populações poliparasitadas. Essa reatividade cruzada reatividade com outros organismos parasitários resulta em um aumento equivocado de sua sensibilidade e uma diminuição da especificidade. Isto ocorre devido ao compartilhamento de epítomos de ligação semelhantes entre as espécies de *Toxocara* spp. e outros helmintos, a exemplo, *Ascaris lumbricoides* (NIEUWENHUIZEN, N.E.; LOPATA, A.L. Anisakis- a food-borne parasite that triggers allergic host defences. Int J Parasitol, 2013).

[17] Para evitar a reatividade cruzada e assegurar a precisão do imunodiagnóstico, é necessária a adsorção dos soros dos pacientes com extrato bruto de *Ascaris lumbricoides* (ALCANTARA-NEVES, N.M.; SANTOS, A.B.; MENDONCA, L.R.; FIGUEIREDO, C.A.V.; CARVALHO, L.C.P. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis*. Experimental Parasitology, 2008). Isso diminui a ligação dos anticorpos anti-*Toxocara* spp. a regiões de epítomos semelhantes às de outros helmintos, aumentando assim a especificidade em áreas endêmicas. Porém, a obtenção do antígeno do TES é bastante laboriosa, pois requer a obtenção de vermes para a extração dos ovos, cultivo dos mesmos à temperatura ambiente até o seu embrionamento. Após esse processo, é necessário um período de aproximadamente três meses para a obtenção do produto excretado-secretado produzido pelas larvas de *T. canis*. Além disso, é essencial obter vermes de *Ascaris lumbricoides* e alérgenos ambientais para proceder à adsorção de anticorpos de outros parasitos no soro do paciente a ser testado para o diagnóstico de *Toxocara* spp.; todo o procedimento, até a elaboração do ensaio, leva em torno de seis meses (NOORDIN, R.; HOLLAND, C.V.;



SMITH, H.V. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. *Toxocara: The Enigmatic Parasite*, 2006).

[18] Tendo em vista todo esse conjunto de variáveis desfavoráveis para um imunodiagnóstico preciso da infecção por *Toxocara* spp., utilizando o antígeno secretado-excretado da larva do *Toxocara* spp., a produção e utilização de proteínas recombinantes produzidas a partir de antígenos larvares deste helminto tem demonstrado resultados satisfatórios, tanto aumentando a especificidade e a sensibilidade do imunodiagnóstico quanto se tornando uma ferramenta mais barata de produção (GASSER, R.B. Molecular tools - advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol*, 2006). Mohamad e colaboradores (2009) (MOHAMAD, S.; AZMI, N.C.; NOORDIN, R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J Clin Microbiol*, 2009), utilizando no imunodiagnóstico as moléculas recombinantes TES-26, TES-30 e TES-120 encontrou especificidades de 80% a 93% e sensibilidades de 96.2%, 93.9% e 92.0%, respectivamente. Outros estudos utilizando proteínas recombinantes: arginine kinase, cathepsin L-1, TES-30 e TES-26 do *Toxocara* spp., demonstrou o potencial imunogênico dessas moléculas obtendo resultados mais precisos no imunodiagnóstico da toxocaríase humana, em termos de sensibilidade antígeno-anticorpo (VARGHESE A, RAINA OK, CHANDRA D, MIRDHA BR, KELAWALA NH, SOLANKI JB, KUMAR N, RAVINDRAN R, ARUN A, RIALCH A, LALRINKIMA H, KELAWALA RN, SAMANTA S. 2017. Sero-detection of *Toxocara canis* infection in human with *T. canis* recombinant arginine kinase, cathepsin L-1 and TES-26 antigens. *Acta Parasitol*, 2017; OLAVE, A.M.; MESA, J.A.; BOTERO, J.H.; PATIÑO, E.B.; GARCÍA, G.M.; ALZATE, J.F. Production and evaluation of the recombinant antigen TES-30 of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of toxocariasis. *Biomedica*, 2016).

[19] O estudo mais recente publicado pelo nosso grupo, avaliando o potencial imunogênico das proteínas recombinantes MUC-3, TES-26, CTL-4 e TES-32 encontrou resultados ainda mais satisfatórios dos encontrados nos estudos anteriores citados

acima. Da Silva e colaboradores (2022) (DA SILVA, M.B.; FERNANDES, A.M.S.; DA SILVA, E.S.; URREGO, J.R.; SANTIAGO, L.F.; GARCES, L.F.S.; PORTELA, R.D.; PACHECO, L.G.C.; BRIZA, P.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, C.S.; ALCANTARA-NEVES, N.M. Proteomics and immunoblotting analyses reveal antigens that optimize the immunodiagnosis of the infection by *Toxocara* spp. *Transboundary and emerging diseases*, 2022), encontrou valores de sensibilidade entre 91.7% a 97.3% e especificidade de 94.0% a 97.9% utilizando IgG como anticorpo, já quando utilizou IgG4 como anticorpo encontrou resultados de sensibilidade de 88.8% a 98.3% e especificidade de 97.8% a 97.9%. Avaliando as moléculas rTES-26 e rCTL-4 combinadas os resultados foram ainda melhores, alcançando 100% de sensibilidade e especificidade utilizando o anticorpo IgG4.

[20] Apesar de mais este avanço, a produção dessas moléculas recombinantes individualmente ainda é muito laboriosa e requer diversas padronizações para garantir que elas estejam presentes no ensaio em uma concentração equimolar (1:1). Portanto, propomos aqui, a produção e utilização de proteínas quiméricas que sejam baseadas em epítomos de células B com potencial antigênico e que sejam capazes de alcançar resultados em termos de sensibilidade, especificidade e acurácia no imunodiagnóstico da toxocaríase que aprimorariam a técnica, diminuindo o tempo, a mão de obra e os custos para a produção de apenas uma única molécula que combinasse epítomos de duas ou mais moléculas antigênicas, além disso, diminuindo os casos falso-positivos e falso-negativos devido à reatividade cruzada com antígenos de outros helmintos (SANTOS AB, ROCHA, G.M.; OLIVER, C.; FERRIANI, V.P.; LIMA, R.C.; PALMA, M.S.; SALES, V.S.; AALBERSE, R.C.; CHAPMAN, M.D.; ARRUDA, L.K. Cross-reactive IgE antibody responses totropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. *J Allergy Clin Immunol*. 2008).

[21] Nenhum método atualmente disponível para o diagnóstico da toxocaríase apresenta todas as características desejáveis de elevadas sensibilidade e especificidade, facilidade de execução e baixo custo. Um teste ideal para diagnóstico sorológico para a toxocaríase humana deveria ser focado no uso de antígenos que

possam ser reativos com soros de todos os indivíduos soropositivos, independente da sintomatologia clínica, mas que não devem ser reconhecidos por anticorpos de outros parasitos, ainda que residentes em áreas endêmicas dos mesmos.

[22] Desta forma, a busca de proteínas recombinantes a serem utilizadas como antígeno em testes diagnósticos mais específicos e sensíveis, faz-se necessário. Os avanços tecnológicos têm levado a melhorias significativas no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, sendo considerados úteis para o diagnóstico rápido e preciso de doenças. A produção de proteínas recombinantes isoladamente ainda é dispendiosa e “time-consuming”. Com os novos avanços biotecnológicos e de engenharia genética é possível realizar a busca de regiões específicas de proteínas e construir proteínas quiméricas (híbridas), que consiste na montagem de uma única molécula contendo as sequências mais relevantes dos antígenos nativos principais de mais de uma proteína e que necessitam de menos tempo e de menos recurso para a sua produção (SANTOS, F.L.; CELEDON, P.A.; ZANCHIN, N.I.; BRASIL, T.D.E.A.; FOTI, L.; SOUZA, W.V.; SILVA, E.D.; GOMES, Y.D.E.M, KRIEGER, M.A. Performance Assessment of Four Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens Based on Antigen-Antibody Detection for Diagnosis of Chronic Chagas Disease. PLoS One, 2016).

[23] Dentro das vantagens da produção de proteínas quiméricas estão: i) simplificação da produção da proteína recombinante já que uma única molécula será produzida; (ii) uma única molécula contém a informação imunológica relevante de epítomos de mais de uma proteína ou domínio; (iii) aumento do potencial antigênico; e (iv) possibilidade de exclusão ou inclusão de regiões conservadas.

[24] A presente invenção refere-se ao melhoramento do método de imunodiagnóstico indireto (ELISA indireto) utilizando proteínas quiméricas recombinantes do *Toxocara canis* que foram construídas a partir da seleção *in silico* de epítomos de células B de regiões com maior antigenicidade das proteínas TES-26 e CTL-4 e seu uso no diagnóstico rápido e eficaz de IgG e IgG4 contra *Toxocara canis*. Tanto em soros adsorvidos quanto em soros não adsorvidos, a utilização das moléculas recombinantes

quiméricas (SHORT e FULL) nos forneceu resultados similares, satisfatórios e mais robustos com baixos pontos de corte, altas sensibilidades e especificidades, principalmente quando comparado ao resultado encontrado no estudo das moléculas parentais citadas no item 19 deste documento. Sendo assim, propomos nesta proposta a produção e a utilização de moléculas recombinantes antigênicas como uma abordagem viável e promissora para o desenvolvimento de um ensaio melhorado para toxocaríase humana, o qual minimizaria problemas amplamente encontrados nos testes atuais de imunodiagnóstico da toxocaríase, como por exemplo, a reatividade cruzada com antígenos de outros helmintos e a produção de um antígeno padronizado.

[25] Os detalhes da produção das proteínas recombinantes quiméricas (rSHORT e rFULL) estão descritos a seguir neste documento:

[26] Dois genes quiméricos recombinantes foram construídos após a seleção de epítomos de células B a partir das proteínas TES-26 e CTL-4 do *Toxocara* spp. usando a plataforma IEDB Analysis Resource Consensus Tool (<https://www.iedb.org>). As sequências das proteínas TES-26 e CTL-4 foram obtidas de um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa (DA SILVA, M.B.; FERNANDES, A.M.S.; DA SILVA, E.S.; URREGO, J.R.; SANTIAGO, L.F.; GARCES, L.F.S.; PORTELA, R.D.; PACHECO, L.G.C.; BRIZA, P.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, C.S.; ALCANTARA-NEVES, N.M. Proteomics and immunoblotting analyses reveal antigens that optimize the immunodiagnosis of the infection by *Toxocara* spp. *Transboundary and emerging diseases*, 2022).

[27] Foram então realizadas junções de epítomos de células B com “score” de antigenicidade diferentes para cada proteína. Para a proteína quimérica denominada rSHORT foram utilizadas 4 sequências de epítomos da proteína TES-26 (Scores: 0.952, 0.952, 0.963 e 0.995) e 3 epítomos da proteína CTL-4 (Scores: 1, 1 e 0.969), enquanto para a proteína rFULL foram utilizados todos os 7 epítomos encontrados para a proteína TES-26 (Scores: 0.706, 0.824, 0.894, 0.952, 0.952, 0.963 e 0.995) e 7 epítomos para a proteína CTL-4 (Scores: 0.749, 0.803, 0.879, 0.883, 0.969, 1 e 1).

[28] Na construção gênica, ligantes de peptídeos EAAAK e KK foram inseridos para permitir estabilidade, flexibilidade e garantir a imunorreatividade das moléculas. As sequências escolhidas foram harmonizadas na GenScript (<https://www.genscript.com>) e otimizadas no servidor Tsigner (<https://tisigner.com>) para melhorar o “score” de expressão em *E. coli*. O vetor pET-21a (+) foi o escolhido para clonagem das sequências construídas. Esse vetor possui promotor T7 induzível por IPTG, possui resistência a ampicilina e His-tag N-terminal. Para fins de registro os resultados referentes às construções rSHORT e rFULL serão incluídos nessa patente. Portanto, a partir disso, as sequências de nucleotídeo e de aminoácidos da reivindicação 003, SEQ ID N°.: 1 e SEQ ID N°.: 2 (SHORT) e SEQ ID N°.: 3 e SEQ ID n°.: 4 (FULL) foram finalizadas.

[29] Para processo de transformação, expressão e purificação foram seguidos os seguintes passos:

[30] (i) Os vetores de expressão contendo as sequências harmonizadas foram transformados em *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), incubadas em placas LB-agar (100 µg/mL ampicilina).

[31] (ii) Uma única colônia resistente foi selecionada para expressão proteica, realizada em 5 mL de meio Luria Bertani (LB) (100 µg/mL ampicilina). Neste teste piloto, a indução da expressão foi feita através da adição de 1 mM de Isopropil-b-Dtiogalactopiranósido (IPTG) quando a OD600 alcançou um valor de 0,6. O período de expressão foi de 4h, com 220 rpm à 37 °C.

[32] (iii) Em seguida, o sedimento bacteriano das culturas foi obtido por centrifugação a 4000 g, 20 minutos, 4 °C e ressuspenso em 50 mM solução NaP, pH 9,0. Quatro ciclos de congelamento/descongelamento foram utilizados para lisar as bactérias. Posteriormente, o lisado foi homogeneizado durante 5 minutos, utilizando Ultra-Turrax T25® (IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha). Em seguida, incubou-se o mesmo com DNase I (1:1000) por 2 horas, a 4 °C. A amostra foi então centrifugada a 13000 g durante 20 min, a 4 °C e o sobrenadante recolhido

[33] (iv) Partiu-se para a expressão em maior escala, em 1L de meio LB. Foram utilizados os mesmos parâmetros de tempo e OD de indução que o teste piloto. Em seguida, o sedimento bacteriano da cultura foi obtido por centrifugação a 7000 g, 20 minutos, 4 °C. A avaliação da expressão dos antígenos recombinantes foi realizada em SDS-PAGE a 12%. As duas proteínas quiméricas foram expressas nas mesmas condições e metodologia das proteínas parentais (TES-26 e CTL-4), e migraram, sob condições redutoras, com peso molecular de aproximadamente 17 kDa (rSHORT) e 38 kDa (rFULL).

[34] (v) A purificação das proteínas recombinantes foi realizada através de cromatografia de afinidade automatizada, utilizando uma coluna His-Trap FF (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) no equipamento AKTA pure (GE healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com Tampão A (50mM NaP, pH 9,0) utilizando 10 vezes o volume da coluna. Logo em seguida o sobrenadante contendo as proteínas foram adicionadas. Após a ligação da proteína na coluna, essa foi lavada com o mesmo tampão (10 vezes o volume da coluna). A eluição da proteína foi realizada utilizando outro tampão (50mM NaP, pH 9,0 contendo 500mM de Imidazol), até atingir 100% da concentração desse tampão. Foram coletadas frações de 1mL, e a análise do material foi realizada através de gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue. As frações contendo as proteínas recombinantes purificadas foram concentradas e dialisadas com PBS. O conteúdo proteico foi determinado através do método de Bradford (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Foram determinadas concentrações finais de 662µg/mL (rSHORT) e 770 µg/mL (rFULL).

[35] A confirmação das reatividades das proteínas purificadas foi realizada por meio de Western blotting, utilizando anti-his diluído em PBS-tween 0,05% (1:4000). Após 1h de incubação, foi adicionado o anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (HRP) diluído em PBS 1X (1:4000) por 1 hora sob agitação, a reação foi revelada pela adição do reagente quimiluminescente ECL Western Blotting Substrate (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América), que possibilitou a confirmação da expressão das proteínas rSHORT e rFULL.

[36] Para avaliação das reatividades das proteínas recombinantes foram realizados os seguintes experimentos:

[37] Ensaio de DotBlot, foram utilizadas as proteínas recombinantes quiméricas rSHORT e rFULL, além de uma combinação equimolar das proteínas rTES-26 e rCTL-4 como padrão ouro para avaliação comparativa da reatividade das proteínas. Uma concentração de 4,5µg, diluída em PBS 1X, de cada proteína quimérica, inclusive a mistura de antígenos, foi adicionada em uma membrana de nitrocelulose através de um sistema de transferência por tanque (BioRad) e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram então bloqueadas em PBS 1X suplementado com 5% de leite desnatado, durante 2 horas de incubação. Em seguida, soros previamente testados como positivos (20 casos) e negativos (16 casos) pelo TES-ELISA foram adicionados nas tiras e incubados por 2 horas sob agitação. Depois, um anticorpo anti-IgG humano conjugado à fosfatase alcalina, diluído em PBS 1X (1:4000) foi adicionado e incubado por 1 hora sob agitação. A reação foi revelada usando o Sistema de Substrato Líquido BCIP/NBT (Sigma–Aldrich. Saint Louis, MO, EUA) por 15 minutos de incubação no escuro. As membranas foram submetidas a uma série de lavagens entre as etapas: cinco lavagens com PBS-tween 0,05% e uma lavagem adicional com PBS 1X.

[38] Ensaio de ELISA indireto, microplacas foram sensibilizadas com os antígenos: TES-26 e rCTL-4 combinadas (1:1), rSHORT e rFULL diluídos em tampão carbonato/bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 18 mM, NaHCO<sub>3</sub> 45 mM, pH 9,6) e incubadas overnight a 4°C. Após esse período as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 e bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente para evitar ligações inespecíficas, usando PBS-Tween contendo SFB a 10% (Soro Fetal Bovino). Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20e 1X com PBS 1X. Em seguida foi acrescentado em cada poço 100 µL de soro previamente adsorvido e não adsorvido diluído com PBS/T (1:1000 para IgG e 1:50 para IgG4) e incubados novamente por uma hora em temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com PBS/T e PBS 1X, foi adicionado 100 µL de anticorpo secundário, anti-IgG humano biotilado (1:4000) ou

anti-IgG4 biotilado (1:500) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) diluído em PBS/T/SFB 2,5% e as placas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, após lavagens, foi acrescentado em cada poço 100 µL Streptavidina Peroxidase (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) 1:500 diluída com PBS/T/SFB 2,5%. As placas ficaram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado a cada poço 100 µL de cromógeno TMB (Tetrametilbenzidina). Após essa fase a reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µL de ácido sulfúrico 2N e as placas foram lidas com densidade óptica de 490nm.

[39] A invenção poderá ser melhor compreendida também através da seguinte descrição detalhada, em consonância com as figuras em anexo, onde:

[40] Figura 1. Apresenta o alinhamento das sequências gênicas das proteínas recombinantes rSHORT e rFULL otimizadas para expressão protéica em organismo procaríoto (Codon usage), substituindo códons na sequência original do cDNA por códons mais utilizados pelo hospedeiro no qual foram realizadas as expressões, sem modificar as sequências protéicas.

[41] Figura 2. Representa a análise tridimensional das estruturas terciárias das proteínas quiméricas construídas. Imagem alcançada pelo software AlphaFold2 (<https://alphafold2.ipynb>). A) Estrutura representativa da proteína quimérica rSHORT. B) Estrutura representativa da proteína quimérica rFULL.

[42] Figura 3. Figura 3A) rSHORT, SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie, sendo que a expressão ocorreu por aproximadamente 4H após indução por IPTG. Painel A- (MK) Marcador de peso molecular, (1) Tempo 0H de indução. (2) Tempo 4H de indução. (3) Purificação da proteína. (4) Proteína dialisada. Figura 3C) rFULL, SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie, sendo que a expressão ocorreu por aproximadamente 4H após indução por IPTG. Painel C - (MK) Marcador de peso molecular, (1) Tempo 0H de indução. (2) Tempo 4H de indução. (3) Purificação da proteína. (4) Proteína dialisada. Figura 3B) Western blotting utilizando anti-His-tag para confirmação da expressão da proteína recombinante rSHORT a ser testada no



imunodiagnóstico. MK- Padrão de peso molecular. (1): rSHORT. Figura 3D) Western blotting utilizando anti-His-tag para confirmação da expressão da proteína recombinante rFULL a ser testada no imunodiagnóstico. MK- Padrão de peso molecular. (1): rFULL.

[43] Figura 4. Revela os resultados do Dot blot para a verificação de antigenicidade das proteínas recombinantes utilizadas nesta presente invenção. As moléculas foram testadas numa concentração de 4,5µg/ml em 20 soros positivos e 16 soros negativos para o TES. Após a realização deste ensaio foi possível observar nos soros positivos que a proteína rSHORT foi similarmente reagente quando comparada com a combinação de proteínas (rTES-26 e rCTL-4) usadas como padrão ouro neste ensaio, enquanto que a proteína rFULL mostrou-se menos reativa em todos os soros (Figura 4A, linha 1- TES-26+CTL-4. Linha 2- rSHORT. Linha 3- rFULL). Já nos soros negativos todas as proteínas tiveram pouca ou nenhuma reatividade (Figura 4B, linha 1- TES-26+CTL-4. Linha 2- rSHORT. Linha 3- rFULL).

[44] Figura 5. Representa a análise da reatividade das proteínas recombinantes em soros adsorvidos e não adsorvidos. Imunoensaio (ELISA indireto) utilizando a combinação equimolar das proteínas rTES-26 e rCTL-4 (Mix), rSHORT e rFULL para detecção de níveis séricos de IgG e IgG4. Foram testados soros de indivíduos positivos (N = 142) e negativos (N = 90) para a combinação equimolar das proteínas rTES-26 e rCTL-4 (Mix), que nesta proposta foi usada como “Padrão Ouro”. Os gráficos relacionam o resultado de densidade óptica obtidos em cada ensaio. A linha horizontal vermelha representa o ponto de corte exibido pelo “Padrão Ouro”. A linha preta quase imperceptível é referente a proteína rSHORT e a linha azul é referente a proteína rFULL. Os resultados a esquerda são referentes ao ponto de corte da proteína padrão e os resultados a direita do gráfico são correspondentes aos pontos de corte das proteínas quiméricas. A e B – São referentes aos anticorpos IgG e IgG4 em soros adsorvidos. C e D – São referentes aos anticorpos IgG e IgG4 em soros não adsorvidos.

[45] Figura 6. Representação gráfica das curvas ROC construídas com base nas concentrações dos anticorpos (IgG e IgG4) produzidos frente aos estímulos das proteínas recombinantes quiméricas rSHORT e rFULL. A Linha de Referência é correspondente ao resultado das concentrações de anticorpos produzidos pela combinação das proteínas rTES-26 e rCTL-4 (Padrão Ouro). Reatividades das moléculas recombinantes que foram testadas individualmente em soros adsorvidos (A e B) e em soros não adsorvidos (C e D) usando IgG e IgG4. Linha vermelha – referente à proteína rSHORT. Linha azul – referente à proteína rFULL. As áreas sob a curva (AUC) foram determinadas com um valor de  $p \leq 0,001$ .

[46] Em soros adsorvidos a proteína rSHORT demonstrou AUC de 99% e 96% para IgG e IgG4 respectivamente. Já em soros não adsorvidos esses valores foram 99% e 98% para IgG e IgG4, respectivamente. Já em termos de sensibilidades em soros adsorvidos os valores alcançados foram 98,6% para IgG e 96,5% para IgG4, enquanto para os soros não adsorvidos esses valores foram 99,3% para IgG e 98,5% para IgG4. As especificidades variaram entre 94,4% para IgG e 92,2% para IgG4 nos soros adsorvidos. Nos soros não adsorvidos essa variação foi de 97,8% para IgG e 97,7% para IgG4. Ou seja, não apresentou diferença significativa entre as reatividades das proteínas entre soros adsorvidos ou não adsorvidos.

[47] A proteína rFULL foi menos reativa e em soros adsorvidos alcançou AUC de 92% para IgG e IgG4. Já para soros não adsorvidos esses valores foram AUC =89% para IgG e 94% para IgG4. Os valores de sensibilidade da proteína rFULL foram 93,7% e 88% para IgG e IgG4 em soros adsorvidos e 89,4% para IgG e IgG4 em soros não adsorvidos. As especificidades foram em soros adsorvidos 86,7% e 87,8% para IgG e IgG4, respectivamente. E em soros não adsorvidos foram 81,1% e 87,8% para IgG e IgG4 respectivamente.

[48] Após a realização dos ensaios foi gerada uma tabela contendo os parâmetros encontrados para cada proteína e anticorpo utilizado.

[49] Tabela 1. Validação dos parâmetros encontrados no imunoenensaio (ELISA indireto) desenvolvidos para identificação de anticorpos IgG e IgG4 específicos contra antígenos recombinantes quiméricos do *T. canis* SHORT e FULL, utilizados de forma isolada, levando-se em consideração os resultados das amostras positivas e negativas.

[50] No que se refere ao ensaio imunoenzimático (ELISA indireto), em soros adsorvidos, os resultados demonstraram que quando usado IgG como anticorpo de detecção e rSHORT e rFULL como antígenos, as sensibilidades foram 98,6% e 93,7%; e especificidades de 94,4% e 86,7%, respectivamente. Para IgG4, foram observadas sensibilidades de 96,5% e 88,0% para rSHORT e rFULL; e especificidades de 92,2% e 87,8%, respectivamente. A rSHORT exibiu valores preditivos aprimorados e índice Kappa (k) para ambos IgG e IgG4 em comparação com a rFULL (VPP= 96,55% e 95,14 %; VPN= 97,7% e 94,32%; índice k = 0,93 e 0,89 para IgG e IgG4, respectivamente), enquanto a rFULL exibiu os seguintes resultados (VPP= 91,10% e 91,91 %; VPN= 89,53% e 82,29%; índice k = 0,79 e 0,74 para IgG e IgG4, respectivamente (Tabela 1).

[51] A avaliação da reatividade de soros não adsorvidos aos anticorpos IgG e IgG4 demonstrou sensibilidade e especificidade superiores em comparação com soros adsorvidos quando o antígeno utilizado foi o rSHORT. Observamos para rSHORT sensibilidades de 99,3% para IgG e 98,5% para IgG4, juntamente com especificidades de 97,8% para IgG e 97,7% para IgG4. Quando a rFULL foi utilizada, as sensibilidades foram de 89,4% para ambos IgG e IgG4, e as especificidades foram de 81,1% para IgG e 87,8% para o anticorpo IgG4. A rSHORT exibiu valores preditivos aprimorados e índice Kappa (k) para ambos IgG e IgG4 em comparação com o rFULL (VPP= 98,6% e 98,3%; VPN= 98,8% e 97,7%; índice k= 0,97 e 0,96, IgG e IgG4, respectivamente), enquanto a rFULL exibiu os seguintes resultados (VPP= 88,19% e 92,09 %; VPN= 82,95% e 84,95%; índice k = 0,70 e 0,77 para IgG e IgG4, respectivamente (Tabela 1).

## REIVINDICAÇÕES

- [001] **PROTEÍNAS QUIMÉRICAS RECOMBINANTES** *caracterizadas por* proteínas recombinantes construídas a partir da inclusão *in silico* de regiões específicas de epítomos de células B de proteínas pertencente aos helmintos *Toxocara* spp., as quais exibem potencial antigênico similar ao potencial exibido pelas moléculas parentais, com intuito de utilizá-las no imunodiagnóstico da toxocaríase humana.
- [002] **PROTEÍNAS QUIMÉRICAS RECOMBINANTES de acordo com a reivindicação 001,** *caracterizadas por* sequências de aminoácidos de prováveis epítomos de células B pertencentes as proteínas TES-26 e CTL-4, presentes no excretado-secretado do *Toxocara* spp., com capacidade antigênica.
- [003] **PROTEÍNAS QUIMÉRICAS RECOMBINANTES de acordo com as reivindicações 001 e 002,** *caracterizadas por* sequências de aminoácidos que abrangem a junção de regiões de epítomos de células B com maior *score* de antigenicidade *in silico* e que são similarmente sensíveis e específicas, em comparação às proteínas parentais que as originaram, cujas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos estão representadas respectivamente nas SEQ ID N°.: 1 e SEQ ID N°.: 2 (SHORT) e SEQ ID N°.: 3 e SEQ ID n°.: 4 (FULL).
- [004] **PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS RECOMBINANTES de acordo com reivindicações 001 a 003,** *caracterizado por* compreender as seguintes etapas:
- Revisão da literatura e seleção dos epítomos de células B já descritos;
  - Busca dos *scores* de antigenicidade desses epítomos de células B das proteínas TES-26 e CTL-4 através do *IEDB analysis resource Consensus tool*;
  - Montagem *in silico* das proteínas quiméricas (rSHORT e rFULL) a partir das sequências de aminoácidos das prováveis regiões de epítomos de células B das proteínas TES-26 e CTL-4;
  - Modelagem da estrutura tridimensional de uma proteína quimérica no Alphafold software;
  - Síntese química das sequências gênicas codificadoras e clonagem em vetor plasmidiano de expressão.

- [005] **SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS RECOMBINANTES** de acordo com reivindicações 004 a 005, *caracterizadas pela* existência de regiões específicas em relação às sequências codificadoras das proteínas parentais, assim como contendo resíduos de lisinas (KK) e *linkers* (EAAAK) derivadas de processos de otimização e/ou harmonização de códons com objetivo de aperfeiçoar a expressão heteróloga das mesmas.
- [006] **MÉTODO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARIÁSE HUMANA, caracterizado por** utilizar as proteínas recombinantes rSHORT, rFULL, e compreender as seguintes etapas:
- a. Produção e purificação das proteínas recombinantes rSHORT e rFULL por superexpressão de forma heteróloga, utilizando as sequências das proteínas recombinantes rSHORT e rFULL;
  - b. Adsorção das proteínas obtidas em “a” em um suporte ou carreador, sendo preferencialmente em placa de microtitulação de fundo chato e alta ligação, preferencialmente de 96 poços, com 100 a 200 µL por poço da concentração de 0,5 a 5 µg/mL de cada proteína, sendo preferencialmente 5 µg/mL de cada proteína, em pH 8,6 a 10,6;
  - c. Incubação do suporte ou carreador obtido em “b”, a uma temperatura entre 2 a 8°C, por 12 a 22 horas;
  - d. Lavagem do suporte ou carreador obtido em “c”, de 1 a 4 vezes com solução tamponada PBS-Tween 0,5% pH 7,0 a 8,0 (PBST);
  - e. Bloqueio do suporte ou carreador obtido em “d”, com 100 a 250 µL por poço de PBST adicionado de soro fetal bovino a 5%, e incubação por 30 a 90 min a uma temperatura entre 30 e 40°C, preferencialmente em câmara úmida;
  - f. Lavagem do suporte obtido em “e” com PBST por 1 a 4 vezes;
  - g. Exposição do suporte obtido em “f” aos soros a serem testados, adicionando 80 a 150 µL de soro diluído em PBST 1:100 a 1:1000, sendo preferencialmente 1:50 (IgG4) e 1:1000 (IgG), preferencialmente adicionado de soro fetal bovino a 0,5-1,0%;

- h. Adição de 50 a 150  $\mu$ L de um anticorpo secundário, preferencialmente anti-IgG humano biotilado, ou uma proteína que esteja conjugada a uma enzima ou a um marcador e que se ligue aos anticorpos anti-rSHORT e anti-rFULL eventualmente presentes nos soros da etapa “g”, utilizando a diluição do conjugado entre 1:500 e 1: 4.000, sendo preferencialmente 1:4.000 para IgG e 1:500 para IgG4;
- i. Incubação do suporte obtido em “h” por 40 a 90 minutos a uma temperatura na faixa de 30 a 45°C, preferencialmente em câmara úmida;
- j. Lavagem do suporte obtido em “i” com PBST, por 1 a 6 vezes;
- k. Detecção dos anticorpos no suporte obtido na etapa “j” utilizando reagentes capazes de detectar a enzima ou os marcadores citados na etapa “h”.

[007] **MÉTODO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARÍASE HUMANA, de acordo com a reivindicação 006, etapa “h”, caracterizado pela** enzima ser selecionada do grupo compreendendo acetilcolinesterase, lactato desidrogenase,  $\beta$ -galactosidase, glicose oxidase, fosfatase alcalina e, preferencialmente, peroxidase; e o marcador ser selecionado do grupo compreendendo enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

[008] **MÉTODO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARÍASE HUMANA, de acordo com a reivindicação 006, etapa “k”, caracterizado pela** detecção ser realizada utilizando reagentes selecionados do grupo compreendendo substratos cromógenos que são reconhecidos por alguma das enzimas ou algum dos marcadores da etapa “h”, preferencialmente o cromógeno 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) ou o-phenylenediaminedihydrochloride (OPD), através das seguintes etapas:

- a. Lavagem do suporte com PBS-Tween 0,5% pH 7,0 a 8,0 por 1 a 6 vezes;
- b. Colocação do substrato, preferencialmente o 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) ou o-phenylenediaminedihydrochloride (OPD);
- c. Bloqueio da reação, preferencialmente com ácido clorídrico a 2N;
- d. Avaliação do resultado, preferencialmente por leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda preferencial de 450 a 500 nm.

- [009] **KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARÍASE HUMANA, caracterizado por** compreender:
- a. Um suporte sólido ou um carreador contendo as proteínas recombinantes rSHORT e rFULL isoladas;
  - b. Um anticorpo secundário ou uma proteína conjugada a uma enzima ou a um marcador;
  - c. Um reagente para detectar a enzima ou o marcador.
- [010] **KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARÍASE HUMANA, de acordo com a reivindicação 009, item “a”, caracterizado pelo** suporte sólido ser selecionado do grupo de materiais compreendendo nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e/ou poliestireno; podendo o suporte sólido consistir, preferencialmente, em placas de microtitulação de 96 poços, tubos, esferas ou papéis de nitrocelulose e/ou nylon. O carreador pode ser partículas de ouro ou sílica funcionalizadas com 3-aminopropilo.
- [011] **KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARÍASE HUMANA, de acordo com a reivindicação 009, item “b”, caracterizado pela** enzima ser selecionada do grupo compreendendo acetilcolinesterase, lactato desidrogenase,  $\beta$ -galactosidase, glicose oxidase, fosfatase alcalina e, preferencialmente, peroxidase; e o marcador ser selecionado do grupo compreendendo enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.
- [012] **KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARÍASE HUMANA, de acordo com a reivindicação 009, item “c”, caracterizado pelos** reagentes serem selecionados do grupo compreendendo substratos cromógenos que são reconhecidos por alguma das enzimas ou algum dos marcadores da reivindicação 6, preferencialmente o 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) ou o-phenylenediaminedihydrochloride (OPD).

## FIGURAS

### FIGURA 1

#### SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS DAS MOLÉCULAS RECOMBINANTES

##### A) rSHORT

```
ATGCAAGGTCAACAATGTGCAGATACCGCCCAAGGTTGCCAGGCTGGCCCTCAATGCTTTGTGCCGGCGAAGA
AGGGTAACACCTTGACCCTGGACCAGCAGCGGGTGATGCACCGCGATTACCTGGGATGTTGAGGCGAAAAA
GATGATGGGTCCGGAGTTACCCCGGGGGCATGCCGCAAAACACCTTGAATCTCCACTGGCTGAAAAAGAAG
GCGGGCGGTGCGACCCCTGGCAGACTACCAGCGTGCAGTTCCGCCACCGAACGCCGGCTGCAGCCGGAGGCA
GCGGGCAAAAGCCCCAGCTCCGCAACCGGTGACCACTACGACTGCCGCTGCGACCACCACCAGCGCACGTTG
GTAAAAAGAACGGTATGTGCCAACCGAACACGCGGGCTGCAATCCGCCGTGTGCGGCTAATCAGGTCTGTGT
TAAAAAACCGGCGCCGATCCCGCCACCGGCGAGTCCACCACGACGGCACCGGCTACCACGCTGCCCGGCCG
TAA
```

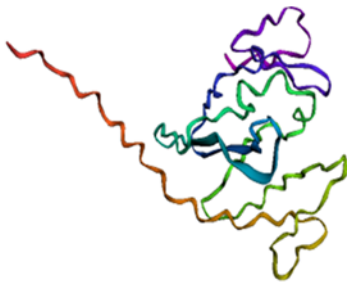
##### B) rFULL

```
ATGCAGGGACAACAATGCGCCGATACCGCTCAAGGTTGCCAAGCAGGTCCGCAATGTTTCGTGCCGGCGAAGA
AGACCTGCCGCCAAACGTGTAAAACGTGCGATTGCCAAGATTACGCGAGCAACTGCGCGGGGTTTGCTAAGAA
AGTGACCTGCGGGTCTGTAGCGGTTGTAGTTCACGCAACCGGTATTGTTCCCGGTTTTATGCAGAAAAAAGG
GTAACACCTTGACGCTGGACCAGCAGGGCGGGTGATGCGCCGGCGATTACCTGGGACGTGCAGGCTAAAAAGAT
GATGGGCCCTGAGTTCACCCCGGGGGCATGCCGAGAATACCTTGAATCTGCATTGGTGAIAAAAAAAGCG
GGCGGCCGTACCCTCGCGGACTACCAGCGCGCAGTGCAGCCACCAATGCCGGCTTACAGCCGAAAAAGGGCA
ACGTGGCCGACCAAATGTTTCGGCGATCGTACCAATTTTCCGCGACCACCTTTCGCTCCACGGAGGCAGCTGC
GAAGTGC GTTCCGGACAACATGGGTTGCCGATGCCGTGCCAAGCCGGTCAAGTATGCGTCCC GCCGAACAAA
AAGGCCCCCGCGCCACAGCCGGTGACAACACTACCAGCGCGCGGCTACGACCACTACCTCTGCGCGTGGTAAGA
AGAACGGTATGTGCCAACCAACAACGCAAGGCTGCAACCCGCGGTGCGCAGCTAATCAGGTCTGTGTGAAAAA
GCCGGCTCCGATCCCGCCGCTGCCCAAAGCACCCTACCAGCACCGGCGACTACCAGAGCTCCGCCGAAAAAG
TTCAATCAGGCGAGCGATTGGTGTACCCAGACCAACAGCCGCCAGTTTGGTTTGATCAATCTAACAAGAAAA
GTGGGTTTGGACCAACGGCTCGCCGCTGATCTTTAGCAATTGGCGTGGTTCGGAACCGGACGGCAAAAAAGGT
GGTAACGTTACCTGCGCCCTGGTTAATTATGCGAACCCGTTCCGGTCAGTGGGACGACGCGGGCTAA
```

### FIGURA 2

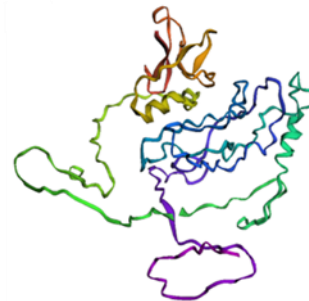
##### A)

rSHORT



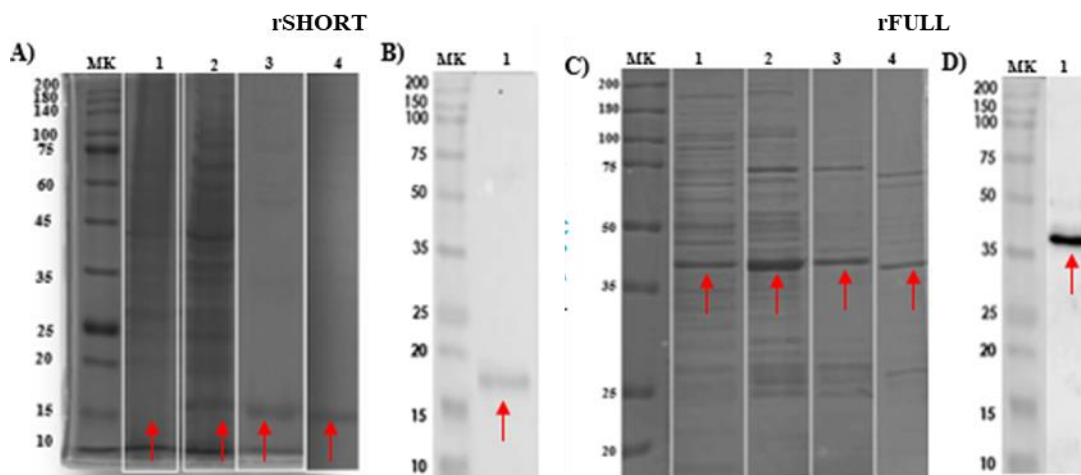
##### B)

rFULL





**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

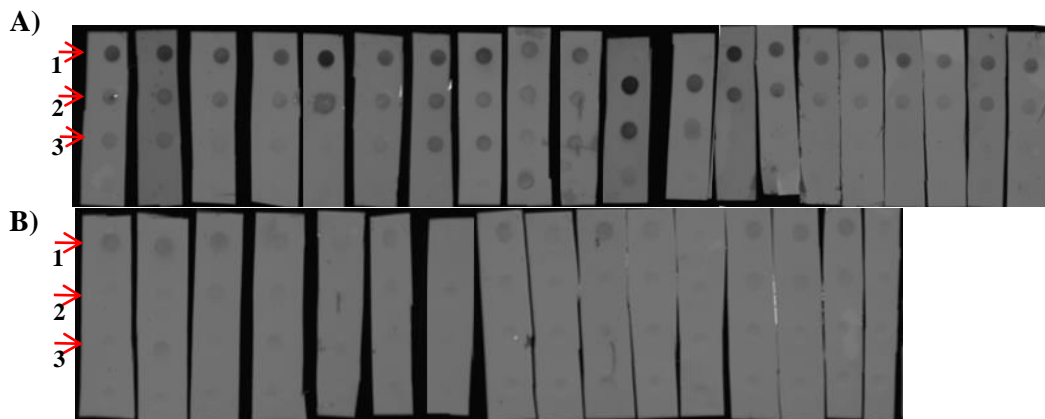


FIGURA 5

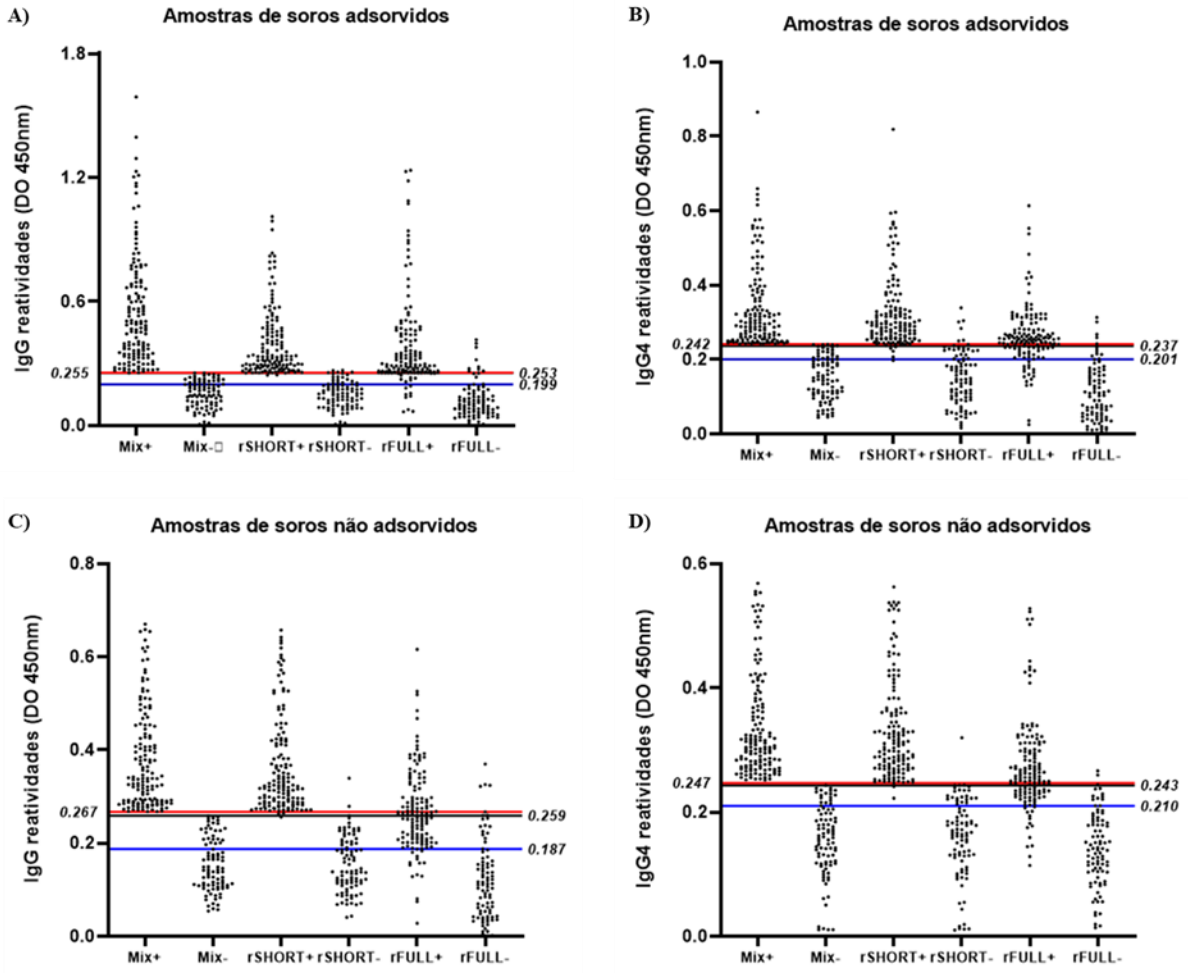
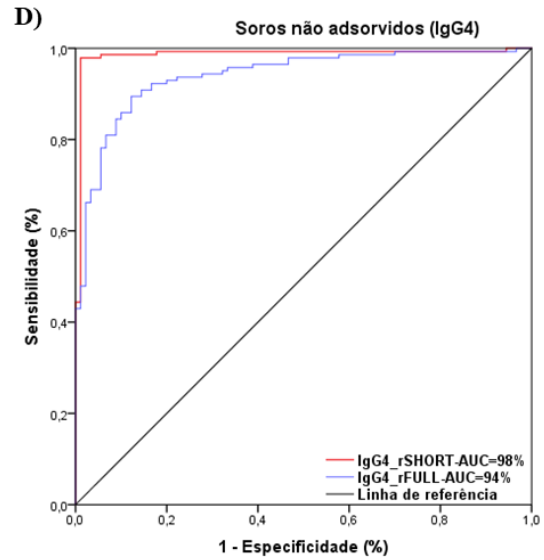
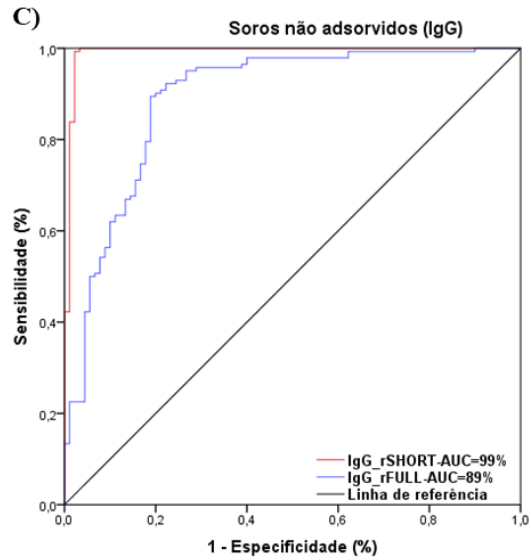
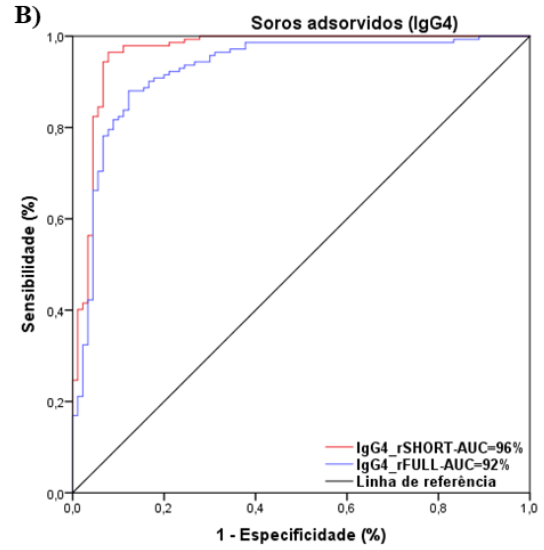
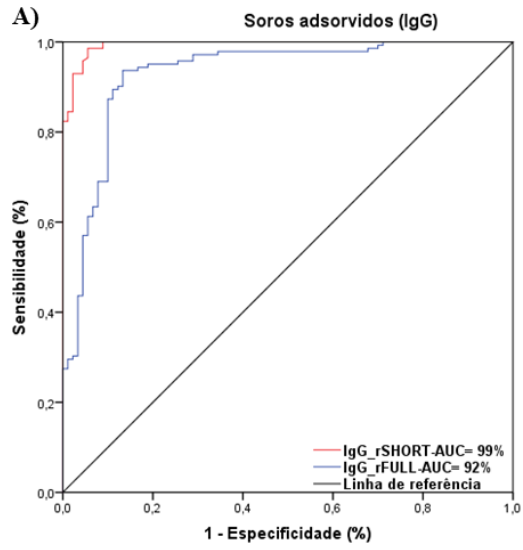


FIGURA 6



TABELA

TABELA 1

Parâmetros	Proteínas recombinantes/Soros adsorvidos				Proteínas recombinantes/Soros não adsorvidos			
	rSHORT		rFULL		rSHORT		rFULL	
	IgG Total	IgG4	IgG Total	IgG4	IgG Total	IgG4	Total IgG	IgG4
Total de Amostras	232							
Controle Positivo	142							
Controle Negativo	90							
Verdadeiramente positivos	140	137	133	125	141	140	127	128
Verdadeiramente negativos	85	83	77	79	88	88	73	79
Falsos negativos	2	5	9	17	1	2	15	14
Falsos positivos	5	7	13	11	2	2	17	11
Ponto de corte	0.253	0.237	0.199	0.201	0.259	0.243	0.187	0.210
Sensibilidade (%)	98.6%	96.5%	93.7%	88.0%	99.3%	98.5%	89.4%	89.4%
Especificidade (%)	94.4%	92.2%	86.7%	87.8%	97.8%	97.7%	81.1%	87.8%
Acurácia (%)	96.98%	94.83%	90.52%	87.93%	98.71%	98.28%	86.21%	89.22%
VPP (%)	96.55%	95.14%	91.10%	91.91%	98.60%	98.59%	88.19%	92.09%
VPN (%)	97.70%	94.32%	89.53%	82.29%	98.88%	97.78%	82.95%	84.95%
<i>Kappa (K)</i>	0.93	0.89	0.79	0.74	0.97	0.96	0.70	0.77

\* Acurácia foi calculada pela proporção de resultados corretos, por exemplo, o total de verdadeiramente positivos somado ao total de resultados verdadeiramente negativos.

\*\* O nível de concordância entre os resultados de cada ELISA e os resultados de ELISA usando a combinação de proteínas (rTES-26 e rCTL-4) foi determinado usando o índice de *Kappa (K)*.

## REFERÊNCIAS

- AHN SJ, RYOO N-K, WOO SJ. 2014. Ocular toxocarosis: clinical features, diagnosis, treatment, and prevention. *Asia Pac Allergy*. 2014; 4 :134–141. doi: 10.5415/apallergy.2014.4.3.134.
- ALCANTARA-NEVES NM, SANTOS AB, MENDONCA LR, FIGUEIREDO CAV, CARVALHO LCP. 2008. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis*. *Experimental Parasitology* 119: 349-351.
- AMARAL, H.L.C., RASSIER, G.L., PEPE, M.S. 2010. Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: a risk factor for visceral larva migrans. *Vet. Parasitol.* 174, 115– 118.
- CARVALHO EAA, ROCHA RL. 2011. Toxocarosis: visceral larva migrans in children. *J Pediatr.* 87:100–110.
- CHIDUMAYO NN. 2020. Prevalence of *Toxocara* in dogs and cats in Africa. *Adv Parasitol.* 2020; 109:861-871. doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.032.
- DA SILVA, M.B., FERNANDES, A.M.S., DA SILVA, E.S., URREGO, J.R., SANTIAGO, L.F., GARCES, L.F.S., PORTELA, R.D., PACHECO, L.G.C., BRIZA, P., FERREIRA, F., PINHEIRO, C.S., ALCANTARA-NEVES, N.M., 2022. Proteomics and immunoblotting analyses reveal antigens that optimize the immunodiagnosis of the infection by *Toxocara* spp. *Transboundary and emerging diseases* 69, e2994-e3006.
- DE SAVIGNY DH, TIZARD IR. 1977. Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 71(6):501-7.
- FICA A, JERCIC MI, NAVARRETE C. 2021. Brain lesions associated with eosinophilia. A useful clue for neurotoxocariasis. Report of one case. *Rev Med Chil.* Nov;149 (11): 1673-1678.
- FILLAUX J; J.-F.MAGNAVAL. 2013. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary Parasitology*. Volume 193, Issue 4, Pages 327-336.
- GAVIGNET B, PIARROUX R, AUBIN F, MILLON L, HUMBERT P. Cutaneous manifestations of human toxocariasis. *J Am Acad Dermatol.* 2008 Dec;59(6):1031-42. doi: 10.1016/j.jaad.2008.06.031. Epub 2008 Sep 14. PMID: 18793816.
- GASSER RB. 2006. Molecular tools - advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol* 136: 69–89.
- GRUNTMEIR JM, THOMPSON NM, LONG MT, BLAGBURN BL, WALDEN HDS. 2021. Detection of heartworm antigen without cross-reactivity to helminths and protozoa following heat treatment of canine serum. *Parasit Vectors.* 2021 Jan 22;14(1):71. doi: 10.1186/s13071-020-04573-6.

- HEWITSON, J.P., GRAINGER, J.R., MAIZELS, R.M., 2009. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* 167, 1-11.
- LACHAUD L, O. CALAS, M.C. PICOT, S. ALBABA, N. BOURGEOIS, F. 2009. Pralong Value of 2 IgG avidity commercial tests used alone or in association to date toxoplasmosis contamination *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 64, pp. 267-274.
- MACPHERSON CNL. 2013. The epidemiology and public health importance of toxocarosis: a zoonosis of global importance. *Int J Parasitol.* 2013;43:999–1008. doi: 10.1016/j.ijpara.
- MAGNAVAL JF, GLICKMAN LT, DORCHIES P, MORASSIN B. 2001. Highlights of human toxocariasis. *The Korean Journal of Parasitology.* 39(1):1-11.
- MAZUR- MELEWSKA, K, MANIA A, FIGLEROWICZ M, KEMNITZ P, SŁUŻEWSKI W, MICHALAK M. 2012. The influence of age on a clinical presentation of *Toxocara* spp. infection in children. *Ann Agric Environ Med.* 19:233–236.
- MENDONÇA LR, VEIGA RV, DATTOLI VCC, FIGUEIREDO CA, FIACCONE R. 2012. *Toxocara* Seropositivity, Atopy and Wheezing in Children Living in Poor Neighbourhoods in Urban Latin American. *PLoS Negl Trop Dis* 6(11): e1886. doi: 10.1371/journal.pntd.0001886.
- MOHAMAD S, AZMI NC, NOORDIN R. 2009. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J Clin Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1712-7. doi: 10.1128/JCM.00001-09. Epub 2009 Apr 15. PMID: 19369434; PMCID: PMC2691092.
- MOREIRA GM, TELMO PDE L, MENDONCA M, MOREIRA AN, MCBRIDE AJ, SCAINI CJ. 2014. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol*; 30(9):456-64.
- NIEUWENHUIZEN, N. E.; LOPATA, A. L. Anisakis- a food-borne parasite that triggers allergic host defences. *Int J Parasitol*, v. 43, n. 12-13, p. 1047-57, Nov 2013. ISSN 1879-0135.
- NOORDIN R, SMITH HV, MOHAMAD S, MAIZELS RM, FONG MY. 2005. Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Trop.* 2005 Jan;93(1):57-62. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.09.009.
- NOORDIN, R., HOLLAND, C. V., & SMITH, H. V. 2006. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. *Toxocara: The Enigmatic Parasite*, 89-112. <https://doi.org/10.1079/9781845930264.0089>.
- OLAVE AM, MESA JA, BOTERO JH, PATIÑO EB, GARCÍA GM, ALZATE JF. 2016. Production and evaluation of the recombinant antigen TES-30 of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of toxocariasis. *Biomedica*; 36(1):39-51. doi: 10.7705/biomedica. v36i1.2617.

OVERGAAUW PA, VAN KNAPEN F. 2012. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol.* 2013 Apr 15;193(4):398-403. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.035. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23305972.

PAWLOWSKI Z. 2001. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J Helminthol.* 2001 Dec;75(4):299-305. doi: 10.1017/s0022149x01000464. PMID: 11818044.

PLATTS-MILLS TA, BLUMENTHAL K, PERZANOWSKI M, WOODFOLK JA. 2000. Determinants of clinical allergic disease. The relevance of indoor allergens to the increase in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Sep;162(3 Pt 2):S128-33. doi: 10.1164/ajrccm.162.supplement\_2.ras-15. PMID: 10988167.

SANDRA GUADALUPE BG, MARIO NOÉ MG, GUSTAVO ESTEBAN PA, NORMA YVETT GB, KARINA CS, ALMA LETICIA CZ, ALAN EDUARDO HS, JOSÉ GUADALUPE HL, ÁLVARO PM, ALEJANDRO GABRIEL GG, MARTHA PM. 2021. Detection of antigens and anti-*Toxocara canis* antibodies in children with different asthma severities. *Immun Inflamm Dis.* 2021 Jun;9(2):435-442. doi: 10.1002/iid3.403. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33559301; PMCID: PMC8127555.

SANTOS FL, CELEDON PA, ZANCHIN NI, BRASIL TDE A, FOTI L, SOUZA WV, SILVA ED, GOMES YDE M, KRIEGER MA. Performance Assessment of Four Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens Based on Antigen-Antibody Detection for Diagnosis of Chronic Chagas Disease. *PLoS One.* 2016 Aug 12;11(8):e0161100. doi: 10.1371/journal.pone.0161100. PMID: 27517281; PMCID: PMC4982698.

SANTOS AB, ROCHA GM, OLIVER C, FERRIANI VP, LIMA RC, PALMA MS, SALES VS, AALBERSE RC, CHAPMAN MD, ARRUDA LK. 2008. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Apr;121(4):1040-6.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2007.12.1147. Epub 2008 Feb 13. PMID: 18275995.

SILVA MB, AMOR ALM, SANTOS LN, GALVÃO AA, OVIEDO VERA AV, SILVA ES, BARBOSA CG, GONÇALVES MS, COOPER PJ, FIGUEIREDO CA, RIBEIRO R DE C, ALCÂNTARA-NEVES NM. 2016. Risk factors for *Toxocara* spp. seroprevalence and its association with atopy and asthma phenotypes in school-age children in a small town and semi-rural areas of Northeast Brazil. *Acta Trop.* 2017;174:158–164. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.04.005.

STRUBE C, HEUER L, JANECEK E. 2012. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol* 2013; 193(4): 375-389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.12.033>.

THOMPSON RCA. Parasite zoonoses and wildlife: one health, spillover and human activity. *Int J. Parasitol* 2013; 43(12-13): 1079-1088. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.007>. PMid: 23892130.

VARGHESE A, RAINA OK, CHANDRA D, MIRDHA BR, KELAWALA NH, SOLANKI JB, KUMAR N, RAVINDRAN R, ARUN A, RIALCH A, LALRINKIMA H, KELAWALA RN, SAMANTA S. 2017. Sero-detection of *Toxocara canis* infection in human with *T. canis*

recombinant arginine kinase, cathepsin L-1 and TES-26 antigens. *Acta Parasitol*; 62(4):775-778.  
doi: 10.1515/ap-2017-0093.



## 8. CONCLUSÃO

Neste estudo utilizamos uma abordagem associativa entre positividade ao anticorpo IgG contra antígenos presentes no excretado-secretado larval do *Toxocara* spp. para identificar prováveis rotas de susceptibilidade para a infecção do ser humano por este nematoide utilizando variáveis sociodemográficas aos quais estes indivíduos estão condicionados ao longo de 8 anos (2005 – 2013). Identificamos que a presença de gato e cão no domicílio e o aumento da idade foram fatores contribuintes para a aquisição desta infecção, enquanto que o maior nível de informação acrescido pelo aumento da escolaridade materna e melhores condições de pavimentação nas ruas foram identificados como fatores de proteção contra esta infecção. Embora não tenha sido identificada na análise estatística associativa que o aumento do salário seja um fator de proteção contra esta infecção, nota-se que no grupo que apresentou maior nível salarial houve uma redução da infecção o que pode estar atrelado ao maior nível de acesso à informação, melhores hábitos de higiene e conscientização sobre vermifugação dos animais.

Outro importante objetivo alcançado foi a construção, produção e testagem de proteínas quiméricas produzidas a partir de proteínas parentais denominadas TES-26 e CTL-4, anteriormente testadas por nosso grupo. Estas proteínas parentais testadas em combinação, apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade no imunodiagnóstico da toxocaríase, porém a produção destas moléculas individualmente encarece e requer um maior tempo de produção, o que comercialmente torna este produto antigênico menos atrativo.

As proteínas quiméricas produzidas e testadas neste trabalho (rSHORT e rFULL), apresentaram valores similares aos parâmetros encontrados utilizando as moléculas parentais podendo ser utilizadas como uma alternativa ao uso de por exemplo, o antígeno excretado-secretado da larva do *Toxocara* spp., clinicamente e comercialmente utilizado. Embora a proteína rFULL também tenha apresentado resultados satisfatórios, ela apresentou um maior número de casos falsos-negativos e falsos-positivos quando comparada a proteína rSHORT, sendo esta última melhor em termos de sensibilidade, especificidade e acurácia, tornando-a uma excelente candidata para ser usada como antígeno no imunodiagnóstico da toxocaríase.

Por fim, além de identificar prováveis fatores de riscos associados a infecção por *Toxocara* spp., visando elucidar maneiras preventivas contra esta infecção, este trabalho ainda produziu moléculas quiméricas capazes de gerar alternativas ao imunodiagnóstico atual da toxocaríase, como por exemplo, pretende-se criar um teste rápido de fluxo lateral para o diagnóstico desta infecção que seja mais preciso, mais rápido, com menor custo de produção e maior acessibilidade para a população.

## 9. REFERÊNCIAS

- AHN SJ, RYOO N-K, WOO SJ. 2014. Ocular toxocarosis: clinical features, diagnosis, treatment, and prevention. *Asia Pac Allergy*. 2014;4:134–141. doi: 10.5415/apallergy.2014.4.3.134.
- ALCANTARA-NEVES, N.M.; BAVIA, E.; SILVAO, R.M.; CARVALHO, E. 1989. Environmental contamination by *Toxacara* sp eggs in public areas of Salvador, Bahia State, Brazil. *Rev Soc Brasileira de Med Trop*, 24: 187-190.
- ALCANTARA-NEVES NM, SANTOS AB, MENDONCA LR, FIGUEIREDO CAV, CARVALHO LCP. 2008. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis*. *Experimental Parasitology* 119: 349-351.
- ALCANTARA-NEVES, NEUZA MARIA; DE S G BRITTO, GABRIELA ; VEIGA, RAFAEL VALENTE ; FIGUEIREDO, CAMILA A ; FIACCONE, ROSIMEIRE LEOVIGILDO ; DA CONCEIÇÃO, JACKSON S ; CRUZ, ÁLVARO AUGUSTO ; RODRIGUES, LAURA CUNHA ; COOPER, PHILIP JOHN ; PONTES-DE-CARVALHO, LAIN C ; BARRETO, MAURÍCIO LIMA. 2014. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC Research Notes*, v. 7, p. 817.
- ALMEIDA, A.B.P.F.; SOUSA, V.R.F.; DALCIN, L.; JUSTINO, C.H.S. 2007. Contaminação por fezes caninas das praças publicas de Cuiaba, Mato Grosso. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.*, Sao Paulo, 44: 132-136.
- ALVAREZ-GUTIÉRREZ FJ, MEDINA-GALLARDO JF, PÉREZ-NAVARRO P, MARTÍN-VILLASCLARAS JJ, ETCHEGOREN BM, ROMERO-ROMERO B. 2010. Relación del test de control del asma (ACT) con la función pulmonar, niveles de óxido nítrico exhalado y grados de control según la Iniciativa Global para el Asma (GINA). *Arch Bronconeumol*. 2010;46:370-7.
- AMARAL, H.L.C., RASSIER, G.L., PEPE, M.S. 2010. Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: a risk factor for visceral larva migrans. *Vet. Parasitol*. 174, 115–118.
- ANARUMA FILHO F, CHIEFFI PP, CORREA CR, CAMARGO ED, DA SILVEIRA EP, ARANHA JJ. 2003. Human toxocariasis: incidence among residents in the outskirts

of Campinas, State of São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003 Sep-Oct;45(5):293-4. doi: 10.1590/s0036-46652003000500010. PMID: 14743671.

BUIJS J, BORSBOOM G, RENTING M, HILGERSOM WJA, VAN WIERINGEN JC, JANSEN G, NEIJENS J. 1997. Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. Eur Respir J, 10: 1467–75.

CAPUANO DM, ROCHA GM. 2005. Environmental contamination by *toxocara* sp. eggs in Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med trop S. Paulo 2005;47(4):223-226.

CAMPOS-FILHO, P.C.; BARROS, L.M.; CAMPOS, J.O.; BRAGA, V.B.; CAZORLA, I.M.; ALBUQUERQUE, G.R.; CARVALHO, S.M. 2008. Zoonotic parasites in dog feces at public squares in the municipality of Itabuna, Bahia, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet, 17:206-9.

CARMENA D, BENTO A, ERASOE. 2006. Antigens for immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. Acta Tropica. V98. P. 74-86.

CARVALHO EAA, ROCHA RL. 2011. Toxocarosis: visceral larva migrans in children. J Pediatr. 87:100–110.

CHIA-KWUNG FAN, CHIEN-WEI LIAO, YU-CHIEH CHENG. 2013. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment Veterinary Parasitology, Volume 193, Issue 4, pp. 342-352.

COOPER, P.J. 2008. *Toxocara canis* infection: an important and neglected environmental risk factor for asthma? Clinical and Experimental Allergy, 38: 551–553.

CHIDUMAYO NN. 2020. Prevalence of *Toxocara* in dogs and cats in Africa. Adv Parasitol. 2020; 109:861-871. doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.032.

CHIEFFI PP, SANTOS SV, QUEIROZ ML, LESCANO SAZ. 2009. Human Toxocariasis: Contribution by Brazilian Researchers. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 51: 301-8.

CHRISTINA STRUBE, LEA HEUER, ELISABETH JANECEK. 2013. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. Veterinary Parasitology, Volume 193, Issue 4, Pages 375-389.

CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.; ADAMS, C.; LAMBILLOTTE, D.; THEIS, J.; GOLDSMITH, R.; KOSS, J.; CHIOINO, C.; WIDJANA, D.P.; SUTISNA, P. 1993. Serosurvey of some major zoonotic infections in children and teenagers in Bali, Indonesia, South East Asian J. Trop. Med. Pub. Health, 24: 321-326.

DA SILVA, M.B., FERNANDES, A.M.S., DA SILVA, E.S., URREGO, J.R., SANTIAGO, L.F., GARCES, L.F.S., PORTELA, R.D., PACHECO, L.G.C., BRIZA, P., FERREIRA, F., PINHEIRO, C.S., ALCANTARA-NEVES, N.M. 2022. Proteomics and immunoblotting analyses reveal antigens that optimize the immunodiagnosis of the infection by *Toxocara* spp. Transboundary and emerging diseases 69, e2994-e3006.

DA SILVA, M.B., FERNANDES, A.M.S., DA SILVA, E.S., URREGO, J.R., SANTIAGO, L.F., GARCES, L.F.S., PORTELA, R.D., PACHECO, L.G.C., BRIZA, P., FERREIRA, F., PINHEIRO, C.S., ALCANTARA-NEVES, N.M., 2022. Proteomics and immunoblotting analyses reveal antigens that optimize the immunodiagnosis of the infection by *Toxocara* spp. Transboundary and emerging diseases 69, e2994-e3006.

DATTOLI VC, FREIRE SM, MENDONÇA LR, SANTOS PC, MEYER R, ALCANTARA-NEVES NM. 2011. *Toxocara canis* infection is associated with eosinophilia and total IgE in blood donors from a large Brazilian centre. Trop Med Int Health. 2011;16:514–517. doi: 10.1111/j.1365-3156.2010.02719.x.

DE SAVIGNY DH, TIZARD IR. 1975. Serodiagnosis of *Toxocara larva migrans* visceral. Canada J Publ Hlth 1975, 66: 52-6.

DESPOMMIER D. 2006. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin Microbiol Rev 2003;16(2):265-272.

DURANT JF, IRENGE LM, FOGT-WYRWAS R, DUMONT C, DOUCET JP, MIGNON B. 2012. Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. Parasit Vectors; 5(1): 288.

FICA A. JERCIC MI, NAVARRETE C. 2021. Brain lesions associated with eosinophilia. A useful clue for neurotoxocariasis. Report of one case. Rev Med Chil. Nov;149 (11): 1673-1678.

FILLAUX J; J.-F. MAGNAVAL. 2013. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary Parasitology*. Volume 193, Issue 4, Pages 327-336.

GASSER RB. 2006. Molecular tools - advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol* 136: 69–89.

GEMS, D., FERGUSON, C.J., ROBERTSON, B.D., NIEVES, R., PAGE, A.P., BLAXTER, M.L., MAIZELS, R.M. 1995. An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *J Biol Chem* 270, 18517-18522.

GUANGXU MA, CELIA V HOLLAND, TAO WANG, ANDREAS HOFMANN, CHIA-KWUNG FAN, RICK M MAIZELS, PETER J HOTEZ, ROBIN B GASSER. 2018. Human toxocariasis. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: e14–24.

GRUNTMEIR JM, THOMPSON NM, LONG MT, BLAGBURN BL, WALDEN HDS. 2021. Detection of heartworm antigen without cross-reactivity to helminths and protozoa following heat treatment of canine serum. *Parasit Vectors*. 2021 Jan 22;14(1):71. doi: 10.1186/s13071-020-04573-6.

HANH NTL, LEE YL, LIN CL, CHOU CM, CHENG PC, QUANG HH, FAN CK. 2020. Evidence for Asthma in the Lungs of Mice Inoculated with Different Doses of *Toxocara canis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2020 Dec;103(6):2305-2314. doi: 10.4269/ajtmh.20-0484.

HEWITSON, J.P., GRAINGER, J.R., MAIZELS, R.M. 2009. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* 167, 1-11.

HOTEZ, P.J.; WILKINS, PP. 2009. Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? *PLOS Neglected Tropical Disease*, 3: 1- 4.

KÖCHLE BR, GARIJO-TOLEDO MM, LLOBAT L, SANSANO-MAESTRE J. 2022. Prevalence of *Toxocara* Eggs in Public Parks in the City of Valencia (Eastern Spain). *Vet Sci*. 2022 May 11;9(5):232. doi: 10.3390/vetsci9050232.

JACOBS DE, ZHU X, GASSER RB, CHILTON NB. 1997. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Trop.* 1997 Nov;68(2):191-200. doi: 10.1016/s0001-706x(97)00093-4. PMID: 9386794.

JÕGI NO, SVANES C, SIIAK SP, LOGAN E, HOLLOWAY JW, IGLAND J, JOHANNESSEN A, LEVIN M, REAL FG, SCHLUNSEN V, HORSNELL WGC, BERTELSEN RJ. 2018. Zoonotic helminth exposure and risk of allergic diseases: A study of two generations in Norway. *Clin Exp Allergy.* 2018 Jan;48(1):66-77. doi: 10.1111/cea.13055.

LACHAUD L, O. CALAS, M.C. PICOT, S. ALBABA, N. BOURGEOIS, F. 2009. Pralong Value of 2 IgG avidity commercial tests used alone or in association to date toxoplasmosis contamination *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 64, pp. 267-274.

LOUKAS, A., DOEDENS, A., HINTZ, M., MAIZELS, R.M. 2000. Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. *Parasitology* 121 Pt 5, 545-554.

MACPHERSON CNL. 2013. The epidemiology and public health importance of toxocarosis: a zoonosis of global importance. *Int J Parasitol.* 2013;43:999–1008. doi: 10.1016/j.ijpara.

MAGNAVAL JF, GLICKMAN LT, DORCHIES P, MORASSIN B. 2001. Highlights of human toxocariasis. *The Korean Journal of Parasitology.* 39(1):1-11.

MAGNAVAL.1991. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Res* 1991.

MARCHIORO AA, COLLI CM, MATTIA S, FALAVIGNA-GUILHERME AL. 2011 a. Avaliação eosinofílica e soropositividade para anticorpos IgG anti-*Toxocara* em crianças atendidas pelo Sistema Único de Saúde [Eosinophilic count and seropositivity for IgG antibodies to *Toxocara* spp. in children assisted at the public health service. 52 - Clinical and ultrasound liver impairment in children with toxocariasis]. *Rev Paul Pediatr.* 2011;29:80–84. doi: 10.1590/S0103-05822011000100013.

MARCHIORO AA, COLLI CM, FERREIRA ÉC, VIOL BM, ARAÚJO SM, FALAVIGNA-GUILHERME AL. 2015b Risk factors associated with toxoplasmosis and toxocariasis in populations of children from nine cities in southern Brazil. *J Helminthol.*

2015 Jul;89(4):428-32. doi: 10.1017/S0022149X14000212. Epub 2014 Apr 11. PMID: 24725417.

MARTIN UO, DEMONTE MA. 2008. Urban Contamination with Zoonotic Parasites in the Central Region of Argentina. *Medicina Buenos Aires* 2008, 68: 363-6.

MAZUR- MELEWSKA, K, MANIA A, FIGLEROWICZ M, KEMNITZ P, SŁUŻEWSKI W, MICHALAK M. 2012. The influence of age on a clinical presentation of *Toxocara* spp. infection in children. *Ann Agric Environ Med.* 19:233–236.

MENDONÇA LR, VEIGA RV, DATTOLI VCC, FIGUEIREDO CA, FIACCONE R. 2012. *Toxocara* Seropositivity, Atopy and Wheezing in Children Living in Poor Neighbourhoods in Urban Latin American. *PLoS Negl Trop Dis* 6(11): e1886. doi:10.1371/journal.pntd.0001886.

MOHAMAD S, AZMI NC, NOORDIN R. 2009. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J Clin Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1712-7. doi: 10.1128/JCM.00001-09. Epub 2009 Apr 15. PMID: 19369434; PMCID: PMC2691092.

MOREIRA, G.M.; TELMO PDE, L.; MENDONCA, M.; MOREIRA, A.N.; MCBRIDE, A.J.; SCAINI, C.J.; CONCEICAO, F.R. 2014. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends in parasitology* 2014, 30, 456-464, doi:10.1016/j.pt.2014.07.003.

NOORDIN R, SMITH HV, MOHAMAD S, MAIZELS RM, FONG MY. 2005. Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Trop.* 2005 Jan;93(1):57-62. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.09.009.

NOUROLLAHI FARD SR, AKHTARDANESH B, SADR S, KHEDRI J, RADFAR MH, SHADMEHR M. 2024. Gastrointestinal helminths infection of free-roaming cats (*Felis catus*) in Southeast Iran. *Vet Med Sci.* 2024 May;10(3):e1422. doi: 10.1002/vms3.1422. PMID: 38504628; PMCID: PMC10951621.

OLAVE AM, MESA JA, BOTERO JH, PATIÑO EB, GARCÍA GM, ALZATE JF. 2016. Production and evaluation of the recombinant antigen TES-30 of *Toxocara canis*



for the immunodiagnosis of toxocariasis. *Biomedica*; 36(1):39-51. doi: 10.7705/biomedica.v36i1.2617.

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

PINELLI E, J.H. ROELFSEMA, S. BRANDES, T. KORTBEEK. 2013. Detection and identification of *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real-time PCR *Veterinary Parasitology*, Volume 193, Issue 4, pp. 337-341.

PECINALI, N.R.; GOMES, R.N.; AMENDOEIRA, F.C.; AUGUSTO C.M. PEREIRA BASTOS C, MARTINS, M.J.Q.A.; PEGADO, C.S.; PEREIRA BASTOS, O.M.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Veterinary Parasitology*, 134: 121–130, 2005.

PINELLI E, BRANDES S, DORMANSW J, GREMMERW E, VAN LOVERENW H. 2007. Infection with the roundworm *Toxocara canis* leads to exacerbation of experimental allergic airway inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 649–58.

PELLOUX, H., FAURE, O. 2004. [Toxocariasis in adults]. *Rev Med Interne* 25, 201-206.

PLATTS-MILLS, T. A.; BLUMENTHAL, K.; PERZANOWSKI, M.; WOODFOLK, J. A. 2000. Determinants of clinical allergic disease. The relevance of indoor allergens to the increase in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 162:128-133.

RODOLPHO JMDA, CAMILLO L, ARAÚJO MSS, SPEZIALI E, COELHO-DOS-REIS JG, CORREIA RDO, NERIS DM, MARTINS-FILHO OA, TEIXEIRA-CARVALHO A AND ANIBAL FDF. 2018. Robust Phenotypic Activation of Eosinophils during Experimental *Toxocara canis* Infection. *Front. Immunol.* 9:64. doi: 10.3389/fimmu.2018.00064.

ROMERO NÚÑEZ C, MENDOZA MARTÍNEZ GD, YAÑEZ ARTEAGA S, PONCE MACOTELA M, BUSTAMANTE MONTES P, RAMÍREZ DURÁN N. 2013 Prevalence and risk factors associated with *Toxocara canis* infection in children. *Sci World J.* 2013;2013:572089. doi: 10.1155/2013/572089.

SALVIANO LDSA, TAGLIA-FERREB KD, LISBOAA S, COSTA ACCA, CAMPOSA HS, MARCH MFP. 2018. Association between fraction of exhaled nitric oxide and

spirometry data and clinical control of asthma in children and adolescents. *Rev Paul Pediatr.* 36(1):17-24.

SANDRA GUADALUPE BG, MARIO NOÉ MG, GUSTAVO ESTEBAN PA, NORMA YVETT GB, KARINA CS, ALMA LETICIA CZ, ALAN EDUARDO HS, JOSÉ GUADALUPE HL, ÁLVARO PM, ALEJANDRO GABRIEL GG, MARTHA PM. 2021. Detection of antigens and anti-*Toxocara canis* antibodies in children with different asthma severities. *Immun Inflamm Dis.* 2021 Jun;9(2):435-442. doi: 10.1002/iid3.403. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33559301; PMCID: PMC8127555.

SANTOS PC, LEHMANN LM, LORENZI C, HIRSCH C, TELMO PL, MATTOS GT, CADORE PS, KLAFKE GB, BERNE ME, GONÇALVES CV, SCAINI CJ. 2015. The Seropositivity of *Toxocara* spp. Antibodies in Pregnant Women Attended at the University Hospital in Southern Brazil and the Factors Associated with Infection. *PLoS One.* 2015 Jul 6;10(7):e0131058. doi: 10.1371/journal.pone.0131058. PMID: 26146833; PMCID: PMC4492739.

SCHOENARDIE ER, SCAINI CJ, BROD CS, PEPE MS, VILLELA MM, MCBRIDE AJ, BORSUK S, BERNE ME. 2013. Seroprevalence of *Toxocara* infection in children from southern Brazil. *J Parasitol.* 2013 Jun;99(3):537-9. doi: 10.1645/GE-3182. PMID: 23738711.

SILVA MB, AMOR ALM, SANTOS LN, GALVÃO AA, OVIEDO VERA AV, SILVA ES, BARBOSA CG, GONÇALVES MS, COOPER PJ, FIGUEIREDO CA, RIBEIRO R DE C, ALCÂNTARA-NEVES NM. 2016. Risk factors for *Toxocara* spp. seroprevalence and its association with atopy and asthma phenotypes in school-age children in a small town and semi-rural areas of Northeast Brazil. *Acta Trop.* 2017;174:158–164. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.04.005.

SILVA SFM, RODRIGUES MG, PIMENTA JL, GOMES CP, FREIRE LH, PEREIRA FEL. 2004. Toxocariasis of the central nervous system: with report of two cases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2004;37(2):169-174.

STRUBE C, HEUER L, JANECEK E. 2012. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol* 2013; 193(4): 375-389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.12.033>.

SCHWARTZ R, BIDAISEE S, FIELDS PJ, MACPHERSON MLA, MACPHERSON CNL. 2021. The epidemiology and control of *Toxocara canis* in puppies. *Parasite Epidemiol Control*. 2021 Dec 8;16:e00232. doi: 10.1016/j.parepi.2021.e00232.

THOMPSON RCA. Parasite zoonoses and wildlife: one health, spillover and human activity. *Int J Parasitol* 2013; 43(12-13): 1079-1088. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.007>. PMID:23892130

WALSH MG. 2011. *Toxocara* infection and diminished lung function in a nationally representative sample from the United States population. *Int J Parasitol*. 41:243–247. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.09.006.

WALSH MG; HASEEB S. 2012. Reduced cognitive function in children with toxocariasis in a nationally representative sample of the United States. *International journal for parasitology* 42(13-14).

WU TK, LIOTTA JL, BOWMAN DD. 2024. Comparison of extracellular vesicle isolation methods for the study of exosome cargo within *Toxocara canis* and *Toxocara cati* excretory secretory (TES) products. *Exp Parasitol*. 2024 Apr 27;261:108765. doi: 10.1016/j.exppara.2024.108765. Epub ahead of print. PMID: 38679126.

YUNUS MH, TAN FARRIZAM SN, ABDUL KARIM IZ, NOORDIN R. 2018. A Lateral Flow Rapid Test for Human Toxocariasis Developed Using Three *Toxocara canis* Recombinant Antigens. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 Jan;98(1):32-38. doi: 10.4269/ajtmh.17-0632. Epub 2018 Jan 1. PMID: 29141740; PMCID: PMC5928741.

VARGHESE A, RAINA OK, CHANDRA D, MIRDHA BR, KELAWALA NH, SOLANKI JB, KUMAR N, RAVINDRAN R, ARUN A, RIALCH A, LALRINKIMA H, KELAWALA RN, SAMANTA S. 2017. Sero-detection of *Toxocara canis* infection in human with *T. canis* recombinant arginine kinase, cathepsin L-1 and TES-26 antigens. *Acta Parasitol*; 62(4):775-778. doi: 10.1515/ap-2017-0093.