

## Uso de reação em cadeia da polimerase PCR para identificação de DNA de *Toxocara canis*

ADRIANE LEITES STROTHMANN<sup>1</sup>; MICAELE QUINTANA DE MOURA<sup>2</sup>;  
WESLEY DOUGLAS DA SILVA TERTO<sup>2</sup>; NATÁLIA BERNE PINTO<sup>2</sup>; MARCIA  
RAQUEL PEGORARO DE MACEDO<sup>2</sup>; MARIA ELISABETH AIRES BERNE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – adri\_ane19@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – michele\_m@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma zoonose, sendo as duas principais espécies ligadas à infecção *Toxocara canis* e *Toxocara cati* (POULSEN et al., 2015). A infecção em humanos ocorre principalmente através de ovos embrionados que são ingeridos junto a água e alimentos contaminados (VIEIRA et al., 2013). As crianças são mais susceptíveis à infecção por *T. canis* (GUILHERME et al., 2013), principalmente devido ao contato com ovos larvados em áreas de recreação, parques, praças e caixas de areia (DESPOMMIER, 2003).

No homem, que é um hospedeiro acidental, os quadros clínicos são bem variáveis, podendo ser assintomáticos ou graves. Alguns fatores podem ser responsáveis pela manifestação clínica da parasitose, dentre eles, idade do indivíduo, órgãos afetados e quantidade de larvas nos tecidos (DESPOMMIER, 2003). A patologia pode se dar em nível visceral, descrita como síndrome da larva *migrans* visceral (LMV), nos olhos, larva *migrans* ocular (LMO), e no sistema nervoso (toxocaríase neurológica), podendo ainda ser assintomática (toxocaríase oculta) (MAIZELS et al., 2006).

As técnicas imunossorológicas são as mais utilizadas para o diagnóstico laboratorial da toxocaríase, porém podem ocorrer diversas reações cruzadas com outros parasitos da superfamília Ascaroidea (JIN et al., 2013). Testes imunológicos que garantem maior especificidade quanto ao *Toxocara* utilizam antígenos de excreção e secreção de larvas (TES) e são realizados por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com a confirmação feita por Western blotting (MAGNAVAL et al., 1991). Porém, também existe a possibilidade de ocorrer reações cruzadas com outros antígenos (SAHU et al., 2013).

Por isso, técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para identificação de espécies de *Toxocara* em vários tipos de amostras (FOGT-WYRWAS et al., 2007; ZHU et al., 2001). Técnicas baseadas em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido utilizadas para a identificação e diferenciação de *Toxocara spp.* (DURANT et al., 2012). Com isso, o objetivo deste trabalho foi padronizar a metodologia de extração e de amplificação de DNA de larvas isoladas e junto a tecidos de camundongos e avaliar o potencial da técnica de PCR para o diagnóstico da toxocaríase.

### 2. METODOLOGIA

Os ovos de *T. canis* foram coletados da tuba uterina de fêmeas adultas do parasito, após foram mantidos em cultivo em solução de formalina a 2% e incubados em estufa BOD a 28° C, por 30 dias, sob aerações diárias para haver o embrionamento. Após as larvas (L3) foram extraídas através da técnica de Baermann modificada (DE SAVIGNY, 1975;). Para extração do DNA as larvas

foram quantificadas e alíquotas de 500, 100, 50, 25, 10 e 5 larvas e um adulto foi utilizado como controle positivo. Após foi feita a extração de DNA de amostras de tecidos de um camundongo *swiss* fêmea contaminadas com larvas de *T. canis*, para avaliar a capacidade da técnica de identificar o DNA do parasito junto ao DNA do hospedeiro. Para que houvesse o conhecimento da quantidade de larvas no tecido, o animal não foi inoculado com larvas de *T. canis*, portanto o experimento teve o seguinte delineamento: após a eutanásia, o encéfalo, pulmão e fígado foram coletados, e cada órgão foi igualmente dividido em duas partes, sendo uma utilizada como teste e a outra como controle negativo. Os órgãos foram mecanicamente macerados e foram adicionadas 100 larvas de *T. canis* à metade do macerado de fígado, pulmão e encéfalo (Teste) e na outra metade de cada órgão não foi realizada nenhuma intervenção (controle negativo). A extração de DNA deu-se através do kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®) com modificações. Para amplificação de DNA foram utilizados dois oligoiniciadores da região inter gene (ITS-2) de DNA ribossômico, construído por Jacobs et al. (1997). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 µL. As temperaturas foram as seguintes: desnaturação a 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s, seguido por mais 7 min, usando um termociclador (Amplitherm – ThermalCycles), mantendo, após os ciclos, a temperatura de 4 °C. A eletroforese foi realizada com volume final de 8 µL em gel de agarose a 2%.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA – 7921).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada a amplificação dos produtos de PCR no tamanho esperado nas amostras de 500, 100, 50, 25, 10 e 5 larvas e na do adulto de *T. canis*, (figura 1), sendo comprovada através da observação dos amplicons em gel de agarose a 2%, indicando que a metodologia de extração e amplificação de larvas de *T. canis* foi adequadamente padronizada. Outros estudos já usaram técnicas moleculares para identificação de espécies de *Toxocara*, a partir de ovos presentes no solo (FOGT-WYRWAS et al, 2007), porém, no presente estudo foi utilizado larvas, indicando a capacidade da técnica de identificação, não apenas a presença do parasito no ambiente, mas também nos tecidos de animais.

Como foi estabelecido um protocolo para extração e amplificação do DNA das larvas de *T. canis*, usando assim um controle positivo adequado, foram iniciados os procedimentos para padronização do protocolo de identificação do DNA de *T. canis* junto a amostras de tecidos de camundongo. Foi possível observar a amplificação de DNA do respectivo parasito no encéfalo, pulmão e fígado contaminados com 100 larvas de *T. canis* (figura 2). Já nas amostras de controle negativo não foi observada nenhuma amplificação dos produtos de PCR, demonstrando a especificidade do primer utilizado (JACOBS, 1997) e corroborando com a hipótese de que esta técnica pode ser uma alternativa diagnóstica (PINELLI et al., 2013).

Assim do mesmo modo que a técnica de PCR tem um forte potencial para ser utilizada como forma de diagnóstico para *Angiostrongylus costaricensis* (DA SILVA et al., 2003), nossos dados indicam a possibilidade de utilizar essa técnica como alternativa diagnóstica para toxocaríase, pois foi constatada a amplificação do DNA de apenas 100 larvas junto aos tecidos de camundongo e de 5 larvas

quando processadas isoladamente, o que nos mostra que o protocolo adotado permite detectar uma pequena quantidade de DNA de *T. canis*.

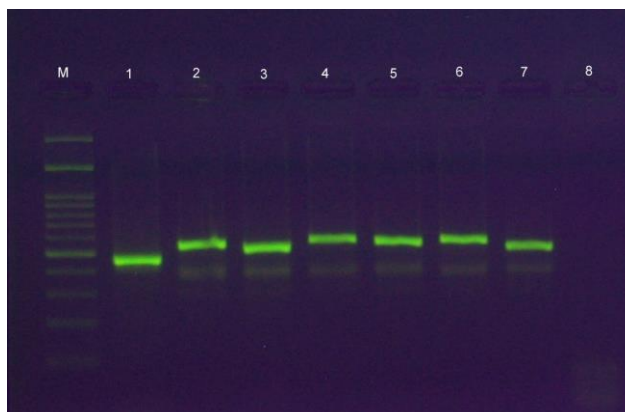


Figura 1: Produtos da amplificação de DNA (PCR) de *Toxocara canis* em gel de agarose 2%: (M) Marcador molecular; (1) Adulto; (2) 500 larvas; (3) 100 larvas; (4) 50 larvas; (5) 25 larvas; (6) 10 larvas; (7) 5 larvas; (8) Branco.

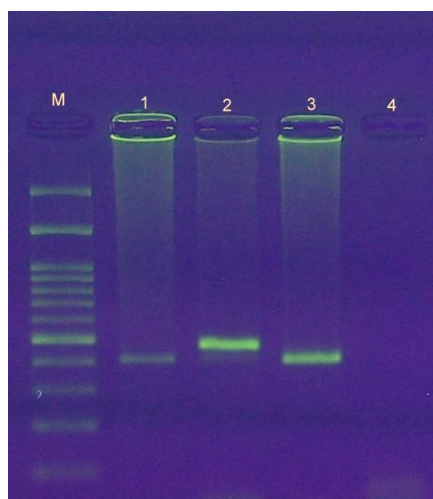


Figura 2: Produtos da amplificação de DNA (PCR) de *Toxocara canis* em gel de agarose 2%: (M) Marcador molecular; (1) fígado + 100 larvas; (2) encéfalo + 100 larvas; (3) pulmão + 100 larvas; (4) Branco.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram uma adequada amplificação de DNA de *T. canis* para os objetivos propostos, indicando o potencial da técnica de PCR para diagnóstico, no entanto, são necessários mais estudos, como a realização de infecção experimental de modelos animais para avaliar a acurácia da reação para fins diagnósticos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORECKA, A.; GAWOR, J.; NIEDWOROK, M.; SORDYL, B. Detection of *Toxocara canis* larvae by PCR in the liver of experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Helminthologia**, v. 45, n. 3, p. 147–149, 2008.
- DA SILVARa Silva, A. C. A., Teixeira, C. G., Zaha, A. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 45, p. 295-297, 2003.
- DE SAVIGNY, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple diagnosis of parasitic and fungal diseases. method for the production of *Toxocara*

- 200 pb 300 pb 264 pb ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **J Parasitol**, v. 61, p.781-2, 1975.
- DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. **Clin Microbiol Rev**, v.16, n.2, p.265-272, 2003.
- DURANT, J.; IRENGE, L.M.; FOGT-WYRWAS, R.; DUMONT, C.; DOUCET, J.; MIGNON, B.; LOSSON, B.; GALA, J. 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. **Parasites & Vectors**, v. 288, n. 5, p. 1-9, 2012.
- FOGT-WYRWAS, R.; JAROSZ, W. & MIZGAJSKA-WIKTOR, H. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. **Journal of Helminthology**, v. 81, n.1, p. 75-78, 2007.
- GUILHERME, E.V.; MARCHIORO, A.A.; ARAUJO, S.M.; FALAVIGNA, D.L.M.; ADAMI, C.; FALAVIGNA-GUILHERME, G.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Toxocariasis in children attending a Public Health Service Pneumology Unit in Paraná State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 55 n. 3, p. 189-92, 2013.
- JACOBS, D.E., ZHU, X., GASSER, R.B., CHILTON, N.B. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog fox and cat. **Acta Trop**, v. 68, p. 191–200, 1997.
- JIN, Y.; SHEN, C.; HUH, S.; SOHN, W.; CHOI, M.; HONG, S. Serodiagnosis of Toxocariasis by ELISA using crude antigen of *Toxocara canis* larvae. **Korean J Parasitol**, v. 51, n. 4, p. 433-439, 2013.
- MAGNAVAL, J.F.; FABRE, R.; MAURIÈRES, P.; CHARLET, J.P.; LARRARD, B. Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitol Res**, v. 77, p. 697-702, 1991.
- MAIZELS, R. M.; SCHABUSSOVA, I.; CALLISTER, D, M.; NICOLL, G. Molecular biology and immunology of *Toxocara canis*. **Toxocara The Enigmatic Parasite**, UK: Cabi Publishing, 2006.
- PINELLI, E.; ROELFSEMA, J, H.; BRANDES, S.; KORTBEEK, T. Detection and identification of *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real-time PCR. **Vet Parasitol**, Vol. 193, No. 4, pp. 337–441, 2013.
- POULSEN, C.S.; SKOV, S.; YOSHIDA, A.; SKALLERUP, P.; MARUYAMA, H.; THAMSBORG, S.M.; NEJSUM, P. Differential serodiagnostics of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* – is it possible? **Parasite Immunology**, n. 37, p. 204–207, 2015.
- SAHU, S.; SAMANTA, S.; SUDHAKAR, N.R.; RAINA, O.K.; GUPTA, S.C.; GOSWAMI, T.K.; MADHU, D.N.; KUMAR, A. Characterization of somatic antigens of adult *Toxocara canis* by western blotting. **Vet World**, v. 6, n. 7, p. 424-427, 2013.
- VIEIRA, J.N.; PEREIRA, C.P, BASTOS, C.G.G.; NAGEL, A.S.; ANTUNES, L.; VILLELA, M.M. Parasitos em hortaliças comercializadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.12, n.1, p.45-49, 2013.
- ZHU, X.Q.; GASSER, R.B.; CHILTON, N.B. & JACOBS, D.E. Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species. **Journal of Helminthology**, Vol.75, No.2, pp. 101-8, 2001.