

USO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE DNA DE *Toxocara canis* EM FÍGADO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS

ADRIANE LEITES STROTHMANN¹, MICAELA QUINTANA DE MOURA²,
WESLEY DOUGLAS DA SILVA TERTO², MÁRCIA RAQUEL PEGORARO DE
MACEDO², MARIA ELISABETH AIRES BERNE³

¹Universidade Federal de Pelotas – adri_ane19@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – micaele.q.m@live.com

³Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma helmintose subdiagnosticada sendo as principais espécies relacionadas à infecção, *Toxocara canis* (LEE et al., 2010) e *Toxocara cati* (FISHER, 2003). A infecção em humanos ocorre principalmente através de ovos embrionados que são ingeridos junto à água e alimentos contaminados (VIEIRA et al., 2013).

No hospedeiro accidental (homem) as larvas de *T. canis* não impetram o intestino delgado, desta forma podem atingir vários órgãos (CHEN et al., 2012). Os quadros clínicos são muito variáveis (SMITH et al, 2009), podendo ser assintomáticos ou mais graves. Alguns fatores podem ser responsáveis pela manifestação clínica da parasitose, dentre os quais, idade, condição imunológica, quantidade de larvas nos órgãos, duração da infecção, dentre outros fatores (ROLDÁN et al., 2010; DESPOMMIER, 2003; CHIEFFI et al., 2009).

Atualmente as técnicas sorológicas utilizando antígeno de secreção e excreção de larvas (TES) são as mais eficazes 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., 1996), mas mesmo assim existe a possibilidade de ocorrer reações cruzadas com outros antígenos (SAHU et al., 2013). Em vista disto é necessário buscar métodos mais específicos para o diagnóstico da toxocaríase. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da técnica de PCR para identificar DNA de larvas de *T. canis* no fígado de camundongos com infecção experimental, aguda e crônica.

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 28º C, por 30 dias, sob aerações diárias para haver o embrionamento. Estes ovos posteriormente foram inoculados através de sonda gástrica nos animais.

Neste estudo foi utilizado um total de 11 camundongos swiss fêmeas com idade entre 4-8 semanas. Nove camundongos foram inoculados com 1.500 ovos embrionados de *T. canis* cada e divididos em dois grupos: G1, com 5 animais e submetidos a eutanásia 48h após a inoculação (infecção aguda) e G2 com 4 animais e submetidos a eutanásia 30 dias após a inoculação (infecção crônica). O

grupo controle foi formado por 2 animais que não foram inoculados. Durante a necropsia foi coletado o fígado de cada animal, que posteriormente foi macerado mecanicamente, sendo que uma fração foi pesada e aliquotada em quintuplicata contendo 20mg para posteriormente realizar a extração de DNA, o restante do tecido foi utilizado para técnica de digestão tecidual, para avaliar a intensidade de infecção presente no tecido (WANG, 1998). A extração de DNA deu-se através do kit comercial WizardGenomic DNA Purification (Promega®), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante 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 50µL, sendo 25µL de Master Mix 2X (Promega®), 1,5 de cada primer (20 µM), 300µg de DNA genômico e 7,0µL de água livre de DNase/RNase (Promega®). As temperaturas utilizadas foram: 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 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 6 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 possível observar a amplificação de DNA de *T. canis* em todos os animais dos grupos G1 e G2 e não se obteve amplificação de DNA do parasito no grupo controle, sendo demonstrada assim a especificidade do oligoiniciador utilizado por JACOBS et al., (1997). Assim como PINELLI et al., (2013) que identificaram DNA de *T. canis* em lavado pulmonar de camundongos experimentalmente infectados, nossos resultados contribuem com a hipótese de que esta técnica pode ser uma alternativa diagnóstica a toxocariase em animais.

Estes resultados são corroborados por ZIBAIEI et al., (2016), que detectaram DNA de larvas de *Toxocara canis* em fígado de frangos de corte, indicando que esse tipo de método pode ser utilizado na prática, identificando a presença das larvas em hospedeiros paratênicos com potencial de infecção humana (DUTRA et al, 2014; MORIMATSU et al. 2006).

A avaliação da intensidade da infecção foi realizada através da técnica de digestão tecidual, na qual se pode observar um maior número de larvas nos fígados dos animais do grupo G1 do que nos animais do grupo G2, conforme tabela 1. Este resultado já era esperado devido à intensidade da infecção ser maior no fígado durante a infecção aguda, quando comparado a animais submetidos à infecção crônica, pois, os ovos após serem ingeridos, chegam ao intestino delgado e liberam as formas larvárias, que atravessam a mucosa intestinal e através da circulação porta atingem o fígado primeiramente (AIRES et al., 2008).

A recuperação de poucas larvas neste tecido (3, 2 e 1 larvas) também indica que a técnica de PCR empregada pôde detectar pequenas quantidades de DNA do parasito junto ao tecido do hospedeiro.

Tabela 1: Amplificação do DNA de *Toxocara canis* no fígado de camundongos experimentalmente infectados, através da PCR e número de larvas recuperadas

	PCR / Nº de Larvas recuperadas													
	G1 (48 h após inoculação)					G2 (30 dias após inoculação)								
Identificação camundongos	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4					
Fígado	+	/	+	/	+	/	+	/ 3	+	/ 2	+	/ 26	+	/ 1

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo foram pertinentes em relação ao objetivo proposto, pois demonstraram uma adequada amplificação de DNA de *T. canis* nos fígados dos animais infectados, indicando, dessa maneira, um grande potencial da técnica de PCR para diagnóstico neste tecido, embora ainda sejam necessários outros estudos em relação aos outros órgãos acometidos por esta zoonose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, W. O., FRIAS, R. B., PASCHOAL, G.R., NEVES, M.F., Toxocaríase e larva migrans visceral. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, 2008. ISSN: 1679-7353

CHEN, J.; ZHOU, D.; NISBET, A.J.; XU, M.; HUANG, S.; LI, M.; WANGE, C.; ZHU, X. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara spp.* **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1344–1348, 2012.

CHIEFFI, P.P.; SANTOS, S.V.; QUEIROZ, M.L.; LESCANO, S.A.Z. Human toxocariasis: contribution by Brazilian researchers. **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 51, n. 6, p. 301-308, 2009.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. **Clin Microbiol Rev**, v.16, n.2, p.265-272, 2003.

DUTRA, G. F. ; PINTO, N. S. F. ; AVILA, L. F. C. ; DUTRA, P. C. ; TELMO, P. L. ; SILVA, L. H. ; AZAMBUJA, A. M. W. ; SCAINI, C.J.. Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs.. **Veterinary Parasitology**, v. 14, p. 00196, 2014.

FISHER, M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. **Trends Parasitol**, v.19, n.4, p.167–170, 2003.

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.

LEE, A.C.Y.; SCHANTZ, P.M.; KAZACOS, K.R.; MONTGOMERY, S.P.; BOWMAN, D.D. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. **Trends Parasitol**, v. 26, n.4, p. 155-161, 2010.

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.

MORIMATSU, Y., AKAO, N., AKIYOSHI, H., KAWAZU, T., OKABE, Y., AIZAWA, H., A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 75, 303-306, 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.

ROLDÁN, W.H.; ESPINOZA, Y.A.; HUAPAYA, P.E.; JIMÉNEZ, S. Diagnóstico de la toxocarosis humana. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 27, n. 4, p. 613-620, 2010.

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.

SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M.; MAGNAVAL, J.F.; SCHANTZ, P.; MAIZELS, R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends Parasitol**, v. 25, n. 4, p. 182-8, 2009.

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.

WANG, G. X.; LUO, Z. J. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, 1998.

ZIBAEI, M., SADJJADI, S.M., MARAGHI, S., The occurrence of *Toxocara* species in naturally infected broiler chickens revealed by molecular approaches. **J, Helminthol**, 30, 1-4, 2016.