

## Imunodianoóstico de Dioctofimatoze em Cães

Gabriela de Almeida Capella<sup>1</sup>; Natalia Berne Pinto<sup>2</sup>; Micaele Quintana de Moura<sup>3</sup>; Guilherme Borges Weege<sup>3</sup>; Josaine Cristina da Silva Rappeti<sup>3</sup>; Maria Elisabeth Aires Berne<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – capellavet@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – nbernevet@gmail.com

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

## 1. INTRODUÇÃO

O nematódeo *Dioctophyma renale* pertence à família Dioctophymatidae, sendo conhecido como o “verme gigante” do rim, pois parasita, principalmente, o rim direito de animais domésticos e silvestres (NAKAGAWA et. al., 2007). O diagnóstico de *D. renale* pode ser estabelecido pela detecção de ovos no sedimento urinário e por técnicas de imagem que possibilitem a visualização de parasitos adultos. No entanto, esses métodos nem sempre são eficazes, pois não é possível o diagnóstico por meio da identificação dos ovos no sedimento urinário nos casos envolvendo parasitos somente do sexo masculino, fêmeas imaturas e localizações ectópicas. Além disso, os animais infectados não costumam demonstrar sinais clínicos, sendo, muitas vezes, o diagnóstico estabelecido por achados de necropsia (LIMA, 2016).

Apesar da dificuldade no estabelecimento do diagnóstico, no Brasil, têm sido frequentes os relatos deste nematódeo parasitando animais silvestres e domésticos (TRINDADE et al., 2017). Alguns estudos epidemiológicos no sul do Brasil, com destaque para a cidade de Pelotas observaram uma significativa frequência desse parasito em hospedeiros definitivos e paratênicos (MASCARENHAS & MULLER, 2015; PERERA, 2016; RAPPETI et al. 2018).

A presença desse nematódeo em cães no nosso meio e a contaminação ambiental é uma realidade, assim como a dificuldade no estabelecimento do diagnóstico de forma eficaz. Isto evidencia a necessidade de estudos que possibilitem viabilizar o diagnóstico desta parasitose por meio da detecção de anticorpos específicos no soro.

## 2. METODOLOGIA

Os nematódeos foram obtidos por nefrectomia de cães parasitados com *D. renale*. Em seguida, os parasitos foram cultivados a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI-1640. O sobrenadante da cultura foi coletado semanalmente por 30 dias, centrifugado a 3000RPM durante 5 minutos e armazenado a -20°C com inibidor de protease 1 mM (fluoreto de fenilmetilsulfonil) para preservação.

Uma amostra DES foi obtida de um pool de sobrenadantes dos cultivos de *D. renale*, os quais foram filtrados duas vezes, primeiro usando uma membrana de 0,22 µm (Millipore) e depois usando uma membrana de 10 kDa (Sigma) a 4°C. O filtrado foi dialisado contra água desionizada a 4°C e depois liofilizado para obter antígenos DES, que foram armazenados a -70°C. Os antígenos DES foram quantificados usando o kit Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (23255).

Para determinar as frações proteicas do antígeno DES foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) na concentração de 12%, em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 e gel de empilhamento na concentração de 5% em tampão Tris/HCl 1,M, pH 6,8. O

antígeno foi ensaiado em canaleta separada no gel (10µg e 5µg) em tampão de amostra com condições redutoras (SDS a 10%, azul de bromofenol a 0,5%, Tris-HCl 0,25M pH 6,8, glicerol a 50% e β mercaptoetanol a 3%). A corrida eletroforética foi realizada em cuba “Mini Protean II” (Bio Rad), contendo tampão de corrida (Tris 0,025M, glicina 0,250M e SDS a 0,1%) e voltagem constante de 150V. O marcador de peso molecular de 10-250 kDa (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards 161-0374) foi utilizado para estimar o peso das frações dos antígenos através da visualização das bandas proteicas no gel corado com azul de Coomassie R250.

Para a obtenção das amostras de soro, foi realizada coleta de sangue em tubos sem anticoagulante da veia jugular de 41 cães positivos para *D. renale* e oito cães negativos. Os soros obtidos foram armazenados a -20 ° C até o uso.

O método ELISA foi padronizado por titulação cruzada com a utilização do antígeno DES. Após a padronização, o antígeno foi utilizado na concentração de 2µg por poço, o soro foi diluído a 1/100 e o conjugado anti-IgG 1/25000 (Sigma Cat A9042). A placa de 96 poços (MaxiSorb®, Nunc) foi sensibilizada com antígeno DES em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6-9,8 e bloqueada com 6% de leite desnatado diluído em PBS com 0,05% de Tween® 20 (Sigma). Após os soros positivos e negativos foram diluídos em PBS pH 7,2, contendo leite em pó 1% e Tween-20 a 0,05% (PBS-T-M1%). Adicionou-se anti-IgG conjugado com peroxidase de rábano (HRP) (Sigma Cat A9042) diluído em PBS-T-M 1%. O antígeno, os soros, e o conjugado, foram incubados durante uma hora, a 37°C. Entre todas as fases do teste as placas foram lavadas por quatro vezes com PBS-T 0,05%. Reações colorimétricas foram desenvolvidas com 1 mg / mL de OPD (Sigma-Aldrich) e 1 µl / mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) diluído em tampão citrato-fosfato, pH 5,0. Após dez minutos a reação foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Sigma-Aldrich). A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (iMark™, Bio-Rad) a 492nm. As amostras foram analisadas em duplicado e os resultados foram expressos como a média OD<sub>492</sub>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sobrenadante das culturas de 25 parasitos adultos contendo os produtos de excreção e secreção foi colhido semanalmente durante seis meses. Após a purificação dos sobrenadantes foram obtidos 12,5mL de DES com concentração proteica de 0,59µg/µl.

Após a corrida eletroforética dos antígenos de *D. renale* foi possível visualizar diferentes frações proteicas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com pesos moleculares variando de 250 a 25Kda.

No ELISA Indireto com o antígeno DES, a média de absorbância dos soros controles de cães positivos para *D. renale* foi de  $1,476 \pm 0,233$  (Figura 1). Todos os cães positivos para *D. renale*, foram também positivos ao ELISA, sendo que somente um apresentou valor de absorbância próximo ao *cut off*. Esse paciente (número 18) no momento da cirurgia apresentava dois parasitos fêmeas no interior do rim direito. No entanto, os parasitos estavam mortos e apresentavam cor verde escura, sem líquido no interior do rim, diferente dos outros animais que havia presença de líquido no interior do rim envolvendo o parasito.

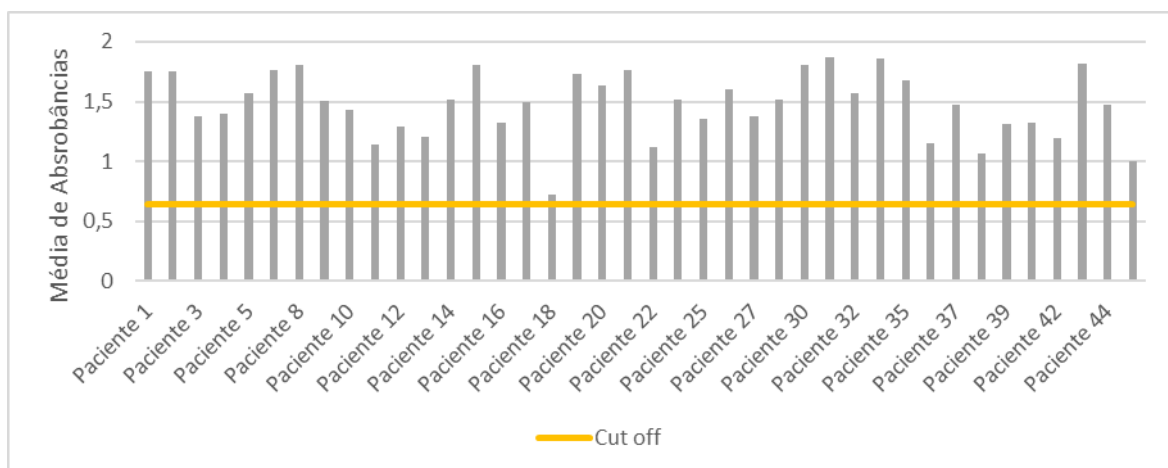


Figura 1. Médias de absorbância no ELISA Indireto dos soros dos cães positivos para *Diectophyme renale* na concentração de 1/100, antígeno de excreção e secreção na concentração de 2 µg/µL e o conjugado 1/25000. Valor *Cut off* médio das absorbâncias dos soros controles negativos mais duas vezes o desvio padrão

Os cães com dioctofimatoze costumam apresentar infecções crônicas e não envolvendo muitos parasitos (NAKAGAWA et al., 2007; PEDRASSANI, 2009). No presente estudo o número de parasitos presente foi de no mínimo um e no máximo oito. Nossos resultados, quanto aos níveis de anticorpos foram superiores ao observado por PEDRASSANI (2015) que verificou títulos inferiores nos cães positivos, utilizando antígeno somático de esôfago. Esta diferença pode ser devido ao antígeno utilizado, que no presente estudo foi de excreção e secreção DES e ou por reação cruzada com *Ancylostoma*, presente em 80% dos animais deste estudo. A próxima etapa será avaliado o ELISA utilizando prévio bloqueio das placas com antígeno de *Ancylostoma*.

#### 4. CONCLUSÕES

O teste de ELISA Indireto utilizando o antígeno DES é promissor e viabilizará, não somente o diagnóstico, mas também a implementação de pesquisas epidemiológicas, imunológicas e moleculares de *D. renale*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NAKAGAWA, T. L. D. R.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; REIS, A. C. F.; YAMAMURA, M. H.; HEADLEY, S. A. Giant kidney worm (*Diectophyme renale*) infections in dogs from Northern Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, p. 366-370, 2007

LIMA, C.S.; MURAKAMI, V.; NAKASU, C.C.T.; MILECH, V.; DURANTE, L.H.; PERERA, S. C.; CLEFF, M.B.; RAPPETI, J.; CRIVELLENTI, L.Z.. *Diectophyme renale* o verme gigante do rim: revisão de literatura. **INVESTIGAÇÃO**, v. 15, p. 37-41, 2016.

MASCARENHAS, C. S. e MÜLLER, G. Third-stage larvae of the enoplid nematode *Diectophyme renale* (Goeze, 1782) in the freshwater turtle *Trachemys dorbigni* from southern Brazil. **Journal of helminthology**, v. 89, n.05, p. 630-635, 2015.

PEDRASSANI, D. **Aspectos morfológicos, imunológicos e epidemiológicos do *Diectophyme renale* em cães o distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina.** 2009. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

PEDRASSANI, D.; do NASCIMENTO, A. A.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Improvement of an enzyme immunosorbent assay for detecting antibodies against *Diectophyma renale*. **Veterinary parasitology**, v. 212, n. 3-4, p. 435-438, 2015.

PERERA, S.C.; CAPELLA, G.A. ; PINTO, N.B. ; RAPPETI, J.; MULLER, G.; BRASIL, R.H.M.A.; GIORDANI, C.; CLEFF, M.B. First isolation of *Diectophyme renale* eggs from an urban environment and identification of those from animal urine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v. 26, n. 1, p. 89-9, 2016.

RAPPETI, J.C.D.S.; MASCARENHAS, C.S.; PERERA, S.C.; MÜLLER, G.; GRECCO, F.B.; SILVA, L.M.C.D.; CLEFF, M.B. *Diectophyme renale* (Nematoda: Enoplida) in domestic dogs and cats in the extreme south of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 119-121, 2017.

TRINDADE, M.A.C.; MACEDO, M.R.P.D.; MULLER, G. *Diectophyme renale* (Nematoda: Diectophymatidae) in *Leopardus geoffroyi* (Carnivora: Felidae) in the Neotropical region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 223-225, 2018.