

## PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA INDIRETO UTILIZANDO O ANTÍGENO DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO DE *Diocetophyme renale*

ADRIANE LEITES STROTHMANN<sup>1</sup>; GABRIELA DE ALMEIDA CAPELLA<sup>2</sup>;  
NATÁLIA BERNE PINHEIRO<sup>3</sup>; CAROLINE DA COSTA MACIEL<sup>4</sup>; MARIA  
ELISABETH AIRES BERNE<sup>5</sup>

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

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

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - nbernevet@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - carolinemacielcosta@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O *Diocetophyma renale* é um nematoide popularmente conhecido como “verme gigante do rim” e é considerado o maior nematódeo de cães (NAKAGAWA et. al., 2007; COTTAR, et al. 2012). A presença deste parasito causa uma doença chamada Diocetofimatose que é uma parasitose renal que destrói progressivamente o rim, fazendo-o resultar em apenas uma cápsula fibrosa (MILANELO et al., 2009). Quando apenas um rim é parasitado, o outro acaba por compensar a função, por isso os cães não costumam apresentar sinais de insuficiência renal, sendo na maioria das vezes assintomáticos (FERREIRA et al., 2010).

O *D. renale* geralmente é encontrado no rim direito, porém há achados no rim esquerdo, cavidade abdominal, cavidade torácica, ureteres, bexiga e tecido subcutâneo de carnívoros domésticos e silvestres (SILVEIRA, et al., 2015). Quando o parasito está alocado no rim, o diagnóstico pode ser realizado através de urinálise, desde que exista a presença de fêmeas, já que somente estas liberam ovos que podem ser visualizados na urina. O diagnóstico também pode ser realizado através de exame de ultrassom ou através de achados acidentais em necropsias e cirurgias (SOUZA et al., 2019), 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 (LIMA, 2016).

A presença desse nematódeo em cães no nosso meio e a contaminação ambiental é uma realidade bastante preocupante, assim como a dificuldade no estabelecimento de diagnóstico de forma eficaz. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica de ELISA indireto como possível forma de diagnóstico para a diocetofimatose.

### 2. METODOLOGIA

Para a obtenção de amostras positivas, foi realizada a coleta de sangue em tubos anticoagulantes de 38 cães infectados com *D. renale*. As amostras de soro utilizadas como controle negativo foram obtidas de sete cães livres de nematódeos gastrintestinais, confirmado por exame de fezes negativos, para *D. renale* em exame de ultrassom abdominal e urinálise. Os soros obtidos foram armazenados a -20 ° C até a utilização.

Para a realização do ELISA indireto, o antígeno DES foi utilizado na concentração de 1µg/100ul por poço, o soro na diluição 1/400 e o conjugado anti-IgG 1/25000 (Sigma Cat A9042). Placas de 96 poços (MaxiSorb®, Nunc) foram

sensibilizadas com o 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%. Os antígenos, 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 H2O2 (Sigma-Aldrich) diluído em tampão citrato-fosfato, pH 5,0. Após dez minutos a reação foi parada com H2SO4 3 Mols (Sigma-Aldrich). A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (iMark™, Bio-Rad) a 492nm. As amostras foram analisadas em duplicatas e os resultados foram expressos como a média OD492. O valor *Cut off* estabelecido foi o valor médio das absorbâncias dos soros controles negativos mais duas vezes o desvio padrão.

A análise estatística utilizando o antígeno DES foi analisada utilizando o software MedCalc.Ink 2019 versão 18.9. Foi determinada a área sob a curva ROC e a sensibilidade e especificidade dessa técnica para o diagnóstico de dirofose em cães.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média de absorbância dos soros controles de cães positivos para *D. renale* encontradas no ELISA Indireto com o antígeno DES foi de  $0,871 \pm 0,252$  (Figura 1). A média dos soros controles de cães negativos foi de  $0,208 \pm 0,083$  que corresponde a 4,187 vezes o valor da média de absorbância dos soros controles de cães positivos.

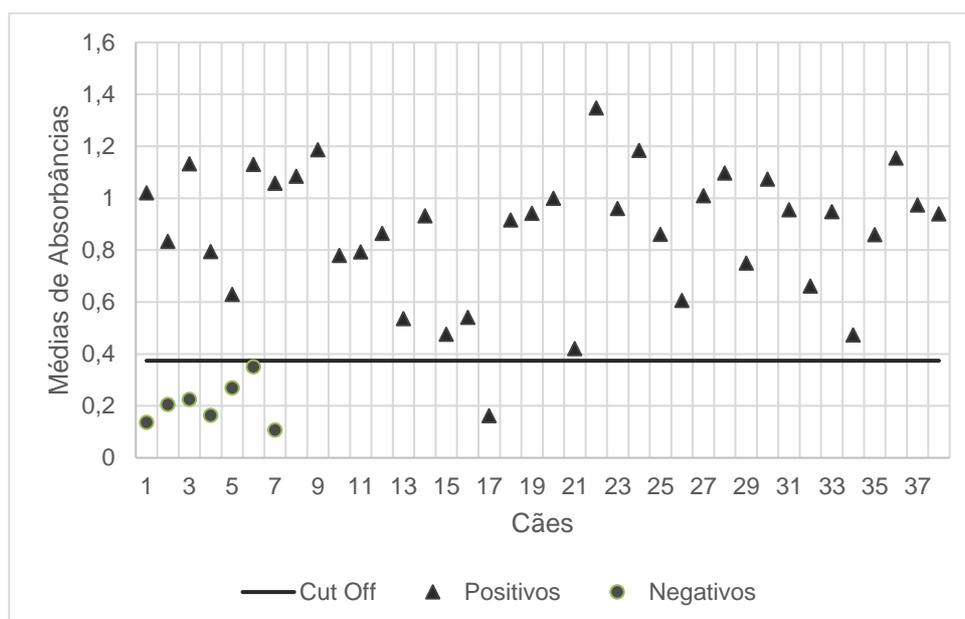


Figura 1: Médias de absorbância no ELISA Indireto dos soros dos cães positivos para *Dirofilaria immitis* na concentração de 1/400, antígeno de excreção e secreção-DES na concentração de 1 µg/100µL e o conjugado 1/25000.

Valor *Cut off*: média das absorbâncias dos soros controles negativos mais duas vezes o desvio padrão.

O valor *Cut off* foi 0,374, o que corresponde ao valor médio das absorbâncias dos soros controles negativos mais duas vezes o desvio padrão. Os cães positivos para *D. renale* foram também positivos ao ELISA, com exceção do animal número 17 que apresentou valor de absorbância inferior ao *cut off*.

A área sob a curva ROC da técnica de ELISA DES encontrada foi de 0,987 ( $p < 0,001$ ). Os índices de especificidade e sensibilidade encontrados neste trabalho para o ELISA Indireto utilizando o antígeno DES foi de 100% de especificidade e de 97,4% de sensibilidade (figura 2). Pedrassani (2009) encontrou valores parecidos com os achados deste trabalho (especificidade 93,8%% e sensibilidade 92,3%) utilizando a mesma técnica com o mesmo parasito.

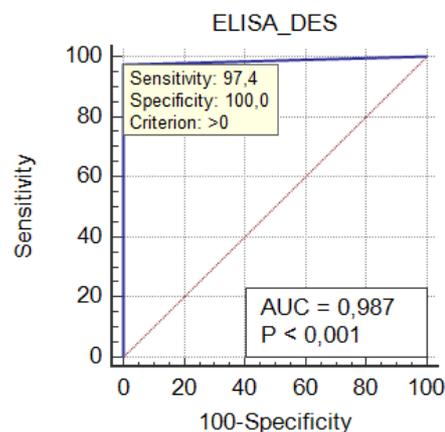


Figura 2: Curva ROC e especificidade e sensibilidade da técnica de ELISA Indireto utilizando antígenos de excreção e secreção (DES).

O diagnóstico sorológico é uma ferramenta importante para estudos epidemiológicos por conseguir detectar infecções em estágios iniciais, mas para além disso, atualmente, existem técnicas que permitem uma especificidade e sensibilidade altíssimas, contribuindo para a obtenção de um diagnóstico mais seguro (DIAS, 2019). Em um estudo realizado por Virgens (2015), a técnica de ELISA para diagnosticar a presença de *Toxocara* se mostrou mais eficaz do que o exame parasitológico, visto que foi encontrada uma baixa positividade em exames parasitológicos frente à uma alta soropositividade no ELISA.

#### 4. CONCLUSÕES

Foi possível padronizar a técnica de ELISA indireto utilizando o antígeno DES, podendo ser utilizada como uma possível forma de diagnóstico para a diotomifatoze, uma vez que os valores encontrados de especificidade e sensibilidade foram satisfatórios.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COTTAR, B. H.; DITTRICH, G.; FERREIRA, A. A.; CARVALHO, A. C. P.; ALBERNAZ, V. G. P.; LUZ, M. T.; TASQUETI, U. I. Ultrasound findings in dogs with *Diocotophyma renale* - a retrospective study. **Vet. e Zootec.** I Simpósio Internacional de Ultrassonografia em Pequenos Animais, Botucatu, SP, 2011.

DIAS, A. S. Avanços no imunodiagnóstico sorológico de Helminntoses. **Ciência Animal**, v.29, n.2, p.80-92, 2019.

FERREIRA, V. L., MEDEIROS, F. P., JULY, J. R., & RASO, T. F. *Diocotophyma renale* in a dog: clinical diagnosis and surgical treatment. **Veterinary parasitology**, v. 168 nº1- 2, p. 151–155, 2010.

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.. *Diocotophyme renale* o verme gigante do rim: revisão de literatura. **Investigação**, v. 15, p. 37-41, 2016.

MILANELO, L.; MOREIRA, M. B.; FITORRA, L. S.; PETRI, B. S.S.; ALVES, M.; SANTOS, A. C. Ocorrência de parasitismo por *Diocotophyma renale* em quatis (*Nasua nasua*) do Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29 nº 12, p. 959-962, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009001200001>.

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

PEDRASSANI, Daniela. **Aspectos morfológicos, imunológicos e epidemiológicos do Diocotophyme renale em cães no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina.** Tese. 131f. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. 2009.

SILVEIRA, C. S.; DIEFENBACH, A.; MISTIERI, M. L.; MACHADO, I. R. L.; ANJOS, B. L. *Diocotophyme renale* em 28 cães: aspectos clinicopatológicos e ultrassonográficos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35 nº11, p. 899-905, 2015. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2015001100005>.

SOUZA, M. S.; DUARTE, G. D.; BRITO, S. A. P.; FARIAS, L. A. *Diocotophyma renale*: **Revisão. PubVet**, v.13, n.6, a346, p.1-6, 2019.

VIRGENS, Carlos José Santos. **Desenvolvimento de ensaio de Elisa Indireto para detecção específica de IgG Anti-Toxocara em cães.** Dissertação. 83f. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia.