

PREVALÊNCIA DE INFECÇÕES POR *CLINOSTOMUM* SPP. E PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR PARA DETECÇÃO DE METACERCÁRIAS EM TECIDOS DE *RHAMDIA QUELEN*

JOÃO PEDRO MELLO SILVA¹; IURI VLADIMIR PIOLY MARMITT²; RODRIGO
CASQUERO CUNHA³; SAMUEL RODRIGUES FÉLIX⁴; LEANDRO QUINTANA
NIZOLI⁵; ÉVERTON FAGONDE DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – silvamjoapedro@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – iurihrs@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – samuelrf@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – leandro.nizoli@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fagondee@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Clinostomum complanatum Rudolphi, 1814 é um trematódeo digenético que infecta moluscos, diversas espécies de peixes de água doce e pássaros piscívoros (LO et al., 1981). Tal parasita possui uma distribuição global e tem sido reportado no Brasil, inclusive em um peixe (*Rhamdia quelen*) de água doce importante economicamente e popularmente conhecido como “Jundiá” (VIANNA et al., 2005; SILVA et al., 2008; DIAS et al., 2016). *R. quelen* reside em várzeas, onde ocorrem periódicas secas e inundações. Essas particularidades do ambiente fizeram com que essa espécie se adaptasse a locais de condições extremamente dinâmicas (DIAS et al., 2006). Dessa forma, *R. quelen* tem apresentado resultados satisfatórios na piscicultura, gerando relevante interesse no cultivo da espécie. Todavia, em seu ciclo de vida o *C. complanatum*, possui como segundo hospedeiro intermediário, alguns peixes de água doce, dentre os quais o Jundiá está inserido. Quando a metacercária desse parasita infecta seu hospedeiro, ela pode se alojar em diversos órgãos e tecidos do mesmo, inclusive os músculos, barbatanas e outras cavidades corporais resultando em alterações comportamentais e patológicas, como a Doença dos Pontos Amarelos (THATCHER, 1981). Os cistos formados por essa metacercária são majoritariamente amarelos e, portanto, quando fixados em músculos geram um aspecto desagradável na carne do peixe que, por sua vez, é descartado durante a inspeção (EIRAS et al., 1999; MILLER et al., 2004). Além disso, quando existem grandes cistos anexados às barbatanas, dificulta-se a locomoção do peixe e, conseqüentemente, sua busca por alimento (PAVANELLI et al., 1998). Todos os fatores direcionam-se à notáveis causas como a saúde do animal e as perdas econômicas. Adicionalmente, o *C. complanatum* também possui potencial zoonótico e alguns autores já relataram casos de faringite ou laringite em humanos que consumiram peixes de água doce crus, os quais estavam infectados por metacercárias do parasito (LEE et al., 2017; PARK et al., 2009; HARA et al., 2014). Quando ingerida, a metacercária atinge o estômago e desencista, após isso, ela migra para a garganta e fixa-se causando uma reação inflamatória no local (SONG et al., 2018). Devido às perdas econômicas, assim

como o potencial zoonótico desse trematódeo, a busca pela eficácia dos ensaios tornou-se alvo nos recentes anos. Técnicas moleculares, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido alvos de estudo (SIMSEK et al., 2018). Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência de infecções por *Clinostomum* em Jundiás capturados na região estuária da Laguna dos Patos e Canal São Gonçalo, e padronizar uma PCR para diagnóstico da presença de metacercárias de *Clinostomum* em amostras de tecidos de peixes capturados neste estuário.

2. METODOLOGIA

No período entre março e novembro de 2019, no Laboratório de Doenças Parasitárias (Faculdade de Veterinária UFPel), foram recebidas amostras de *Rhamdia quelen* capturados por cinco pescadores amadores em locais nas proximidades da Laguna dos Patos, Lagoa Mirim e Canal São Gonçalo. Os espécimes encaminhados eram imediatamente quantificados, visualmente inspecionados, guelras e nadadeiras eram retiradas e as carcaças devolvidas aos pescadores para que fossem direcionadas aos seus respectivos fins. Após a análise visual, as amostras que continham lesões suspeitas foram encaminhadas para realização de exames histopatológicos no Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas (LRD-Faculdade de Veterinária).

Os resultados eram confirmados utilizando chaves parasitológicas e exame microscópico direto das lesões (DIAS et al., 2016). Posteriormente às análises, amostras positivas para *Clinostomum* spp. e, também, com lesões suspeitas foram encaminhadas para extração de DNA. A extração de DNA genômico foi realizada com o Kit "Blood/Tissue DNA Mini Kit da Mebep Bioscience (Ludwig Biotec)". O DNA extraído era validado através de eletroforese em Gel de Agarose 1,5% e quantificação por espectrofotometria no aparelho Nanodrop®. Confirmada a extração do DNA, as amostras foram armazenadas em um ultrafreezer a -78°C. Para o desenho dos *primers*, as sequências de DNA utilizadas foram baseadas nas disponíveis no Genbank, acessadas através da sequência KM923964, referentes ao genoma completo do DNA mitocondrial do *Clinostomum complanatum*. A escolha dos *primers* de regiões específicas foi realizada utilizando a ferramenta "pick primers" disponível na plataforma, apesar disso, optou-se por desenhar três pares de *primers* (Tabela 2.).

Tabela 2. Sequência de *primers* utilizadas na PCR para detecção de *Clinostomum* spp.

Nome	Primer F	Primer R	Amplicor
Primer Clin 1	5' AGCCTACCCGTATCTGTTGC	5' GTGATCCACCG0CTCAGAGT	460 pb
Primer Clin 2	5' TTTTGCCAGGAGCGACAGA	5' TCTTCATCGACACACGAGCC	345 pb
Primer Clin 3	5' TGAAGAGTGCAGCCAAGTGT	5' CTCATTAAGCCACGACCCGA	360 pb

As amostras com extração de DNA confirmadas foram submetidas à PCR. Os componentes da reação foram Master Mix (Ludwig Biotec®), 45 µL de mix, 1 µL de cada *primer* (F e R), 1 µL de DNA de amostras (aproximadamente 100 mg de DNA) e 2 µL de água livre de RNases e DNases. O volume da reação foi de 50 µL. As condições utilizadas no termociclador foram: *Hold* de 95°C por 2 minutos; PCR em 3 etapas (95°C por 30 segundos, 48°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e

15 segundos) com 40 ciclos de repetições; *Hold* final a 4°C por 1 minuto e finalização da reação. Em seguida, após a padronização com amostras positivas, utilizamos o mesmo padrão para avaliar amostras capturadas diretamente pela técnica molecular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da PCR padronizada, empregamos a técnica em 174 amostras de *Rhamdia quelen* recebidas, das quais 63 (36,21%) testaram positivo para *Clinostomum* spp. Os resultados obtidos assemelham-se aos de outros trabalhos descritos na região em que as prevalências de parasitismo foram próximas de 40% (DIAS et al., 2016; VIANNA et al., 2005). Tratando-se dos exames histopatológicos, as amostras submetidas à inspeção e microscopia direta tiveram diagnóstico confirmado. Em relação as reações de PCR também foram positivas tanto para as amostras histologicamente confirmadas quanto para amostras submetidas ao teste sem diagnóstico prévio. Apesar disso, nas condições de corrida empregadas, não houve reações positivas utilizando o *primer* Clin2.

Somente as reações utilizando os *primers* Clin1 e Clin3 foram capazes de detectar e amplificar fragmentos de DNA de *Clinostomum* spp. extraídos de lesões em tecidos musculares de Jundiás. Os produtos das PCR realizadas utilizando os *primers* Clin1 e Clin3 apresentaram bandas nas posições e tamanhos esperados, 460 pares de bases (Clin1) e 360 pares de bases (Clin3). Desse modo, a técnica molecular de PCR demonstra-se efetiva na detecção de *Clinostomum* spp. a partir de lesões musculares em *R. quelen*, podendo ser aplicada no intuito de auxiliar o diagnóstico histopatológico desse parasita.

Considerando o potencial zoonótico desse parasita, a eficácia no diagnóstico desse parasita em Jundiás torna-se relevante, uma vez que já existem relatos de casos de infecções humanas por *C. complanatum* (PARK et al., 2009; LEE et al., 2017) em países asiáticos e, com a ampla disseminação da culinária oriental, inclusive no Brasil, pode-se tornar um fator de risco para consumidores desses alimentos (WILLIAMS et al., 2020). Adicionalmente, o diagnóstico eficaz também auxilia em estudos epidemiológicos, possibilitando melhores avaliações sobre a prevalência e incidência de casos de *Clinostomum* em Jundiás, uma espécie predominante desde o sudeste do México até o centro da Argentina (DIAS et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, a prevalência de infecções por *Clinostomum* na amostra estudada, a partir de animais da região estuária da Laguna dos Patos e Canal São Gonçalo é de 36,21%. Além disso, PCR apresenta-se como uma ferramenta eficaz na detecção de *Clinostomum* a partir de lesões de tecidos provenientes de *Rhamdia quelen*, pois a técnica foi capaz de confirmar diagnósticos positivos previamente confirmados e detectar novos positivos em amostras sem prévia avaliação histopatológica. Adicionalmente, a PCR pode ser uma ferramenta auxiliar no diagnóstico desse parasita elevando não só a sensibilidade, mas também a rapidez do teste. Tais fatores serão de grande importância para futuros estudos epidemiológicos, assim como para saúde pública, visto que o consumo de peixes de água doce, típico da culinária oriental, permanece em constante expansão no Rio Grande do Sul e no Brasil.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dias, M. L. G. G., Minte-Vera, C. V., Eiras, J. C., Machado, M. H., Souza, G. T. R., & Pavanelli, G. C. (2006). Ecology of *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1814 (Trematoda: Clinostomidae) infecting fish from the floodplain of the high Paraná River, Brazil. *Parasitology research*, 99(6), 675-681.
- Dias, J. S., Pozza, A., Pesenti, T. C., Pereira Jr, J., & Berne, M. E. A. (2016). Helminthos parasitos de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) no sul do Brasil. *Science and Animal Health*, 4(1), 02-20.
- EIRAS, J.C.; DIAS, M.L.G.; PAVANELLI, G.C.; MACHADO, M.H. Histological Studies on the Effects of *Clinostomum marginatum* (Digenea: Clinostomidae) in its Second Intermediate Host *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae) of the Upper Paraná, Brazil. *Acta Scientifica*, San Miguel, v.21, n.1, p.237-241, 1999.
- Hara, H., Miyauchi, Y., Tahara, S., & Yamashita, H. (2014). Human laryngitis caused by *Clinostomum complanatum*. *Nagoya journal of medical science*, 76(1-2), 181.
- Lee GS, Park SW, Kim J, Seo KS, You KW, Chung JH, Moon HC, Hong GY (2017) A case of endoscopically treated laryngopharyngitis resulting from *Clinostomum complanatum* infection. *Korean J Gastroenterol* 69(3):177–180.
- Lo, C. F., Huber, F., Kou, G. H., & Lo, C. J. (1981). Studies of *Clinostomum complanatum* (RUD., 1819). *Fish Pathology*, 15(3-4), 219-227.
- MILLER, D.L.; BURSEY, C.R.; GRAY, M.J.; SMITH, L.M. Metacercariae of *Clinostomum attenuatum* in *Ambystoma tigrinum mavortium*, *Bufo cognatus* and *Spea multiplicata* from West Texas. *Journal of Helminthology*, London, v.78, n.4, p.373–376, 2004.
- Park, C. W., Kim, J. S., Joo, H. S., & Kim, J. (2009). A human case of *Clinostomum complanatum* infection in Korea. *The Korean journal of parasitology*, 47(4), 401.
- Pavanelli, G. C., Eiras, J. C., & Takemoto, R. M. (1998). Doenças de peixes: Profilaxia. *Diagnóstico e Tratamento*, 3.
- Silva, A. S., Monteiro, S. G., Doyle, R. L., Pedron, F. A., Filipetto, J. E., & Radunz-Neto, J. (2008). Ocorrência de *Clinostomum complanatum* em diferentes espécies de peixes de uma piscicultura do Município de Santa Maria–RS. *Veterinária e Zootecnia*, 15(1), 27-32.
- SIMSEK, E. et al. Occurrence and molecular characterization of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomidae) in freshwater fishes caught from Turkey. *Parasitology Research*, [s. l.], v. 117, n. 7, p. 2117–2124, 2018
- Song, H. B., Choi, M. H., & Chung, E. J. (2018). Human laryngeal infection by *Clinostomum complanatum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(1), 7.
- Thatcher, V. E. (1981). Patologia de peixes da Amazônia Brasileira, 1. Aspectos gerais. *Acta Amazonica*, 11(1), 125-140.
- Vianna, R. T., Pereira Júnior, J., & Brandão, D. A. (2005). *Clinostomum complanatum* (Digenea, Clinostomidae) density in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) from South Brazil. *Brazilian Archives of biology and Technology*, 48(4), 635-642.
- Williams, M., Hernandez-Jover, M., & Shamsi, S. (2020). Fish substitutions which may increase human health risks from zoonotic seafood borne parasites: A review. *Food Control*, 107429.