**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# ASPECTOS MORFOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO *Dioctophyme renale* EM CÃES NO DISTRITO DE SÃO CRISTÓVÃO, TRÊS BARRAS, SANTA CATARINA.

**Daniela Pedrassani**

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Novembro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# ASPECTOS MORFOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO *Dioctophyme renale* EM CÃES NO DISTRITO DE SÃO CRISTÓVÃO, TRÊS BARRAS, SANTA CATARINA.

**Daniela Pedrassani**

Orientador: Prof. Dr. Adjair Antônio do Nascimento

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Novembro de 2009

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** ASPECTOS MORFOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO *Dioctophyme renale* EM CÃES NO DISTRITO DE SÃO CRISTOVÃO, TRÊS BARRAS, SANTA CATARINA.

**AUTORA:** **DANIELA PEDRASSANI**

**ORIENTADOR:** **Dr. ADJAIR ANTONIO DO NASCIMENTO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:

Dr. ADJAIR ANTONIO DO NASCIMENTO

Dr. MILTON HISSASHI YAMAMURA

Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL

Dr. ALESSANDRO FRANCISCO TALAMINI DO AMARANTE

Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Data da realização: 16 de novembro de 2009.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ADJAIR ANTONIO DO NASCIMENTO

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**DANIELA PEDRASSANI** – casada, nascida na cidade de Canoinhas/SC em 20 de agosto de 1974. É Médica Veterinária formada pela Universidade Federal do Paraná, em 1998. Recebeu o "Prêmio Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado do Paraná - 1° Colocado no Curso de Medicina Veterinár ia 1998", por ter obtido a maior média entre as disciplinas ministradas durante o curso de Medicina Veterinária. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária (nível de mestrado) da Universidade Federal do Paraná em 1999 sob a orientação da Prof[a] Dr[a] Vanete Thomaz Soccol, com a dissertação intitulada: "Prevalência de título de anticorpos imunoglobulinas G anti-*Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909, em cães". Em 2000, ingressou na Universidade do Contestado, Campus Canoinhas, onde ministra no Curso de Medicina Veterinária, as disciplinas de Parasitologia Veterinária e Zoonoses. Em março de 2006, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, nível doutorado, da Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal/SP.

*Dedicatória*

*Dedico esta tese ao meu marido Flavio, a minha mãe Maria Carmela e ao meu pai Auri (in memorian). Vocês são a razão de minha alegria.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Aos meus pais Maria Carmela Fuck Pedrassani e Auri Geraldo Ferri Pedrassani (in memoriam) que sempre me incentivaram e são exemplos de conduta.

Aos meus irmãos Gisela, Gilson, Sandro, Raquel e Geraldo. Tenho muito orgulho de ter cada um de vocês em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Adjair Antônio do Nascimento, por todo o carinho, paciência, tranqüilidade e orientações repassadas.

A Profa. Rosangela Zacarias Machado, por ter me recebido em seu laboratório e por toda atenção e carinho a mim dispensada.

A Profa. Vanete Thomaz Soccol, exemplo de profissional que muito admiro.

A Universidade do Contestado pelo incentivo e apoio financeiro.

Ao colega Neuri Avancini, seu auxilio nas coletas e necropsias foi fundamental para o trabalho.

Aos alunos que auxiliaram nas coletas, nos exames e nas cirurgias – Fernanda, Marilia e Everton, Iaran, Maicon - sem vocês este trabalho seria muito difícil e bem menos alegre.

Aos professores colegas da Medicina Veterinária da UnC (Hamilton, Fedalto, Pacheco, Dodani, Edumar e Beto), sempre presentes nos incentivando nos momentos de dificuldades.

Aos colegas do Hospital Veterinário da UnC (Profa. Simone, Prof. Pilati, Prof. Waldir, Profa. Itaira, Juliana, Valdeci, Joel, Sônia (in memoriam) e Marilete).

Ao Prof. Schimalski por todo auxílio com os mapas e GPS.

Aos colegas do Laboratório de Enfermidades Parasitárias, Hermes, Katyane, Fagner, Roberto, Néio e em especial ao Estevam e José Tebaldi, pelo auxilio nas identificações e pelas boas risadas.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia, Tamires, Tricia, Marcos, Andréia, Carol, Rafaela, Marcia e Carla. Muito trabalho, mas em um ambiente alegre tudo se torna mais prazeiroso.

A minha amiga Gabriela S. C. M. R. A. Bueno, por toda ajuda e paciência durante este período.

## SUMÁRIO

**Página**

**LISTA DE TABELAS ..... ix**

**LISTA DE FIGURAS ..... x**

**LISTA DE PRANCHAS ..... xii**

**CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS ..... 1**

1. INTRODUÇÃO ..... 1

2. *Dioctophyme renale* E DIOCTOFIMATOSE ..... 3

3. CICLO BIOLÓGICO ..... 4

4. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E OCORRÊNCIA ..... 7

5. HOSPEDEIROS ..... 8

5.1. HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS ..... 8

5.2. HOSPEDEIROS DEFINITIVOS ..... 9

5.3. HOSPEDEIROS PARATÊNICOS ..... 10

6. LIMITAÇÕES AMBIENTAIS ..... 11

7. PATOGENIA ..... 12

8. SINAIS CLÍNICOS ..... 13

9. MEIOS DIAGNÓSTICOS ..... 14

10. IMUNIDADE ..... 17

11. CONTROLE E TRATAMENTO ..... 17

12. IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA ..... 18

**CAPÍTULO II ..... 19**

**MORFOLOGIA DE OVOS DE *Dioctophyme renale* Goeze, 1782 (Nematoda: Dioctophymatidae) E INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁDIO NOS OVOS. ..... 19**

1. INTRODUÇÃO ..... 20

2. MATERIAL E MÉTODOS ..... 21

2.1. OBTENÇÃO DOS OVOS DE *Dioctophyme renale*. ..... 21

2.2. AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA ..... 21

2.3. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA ..... 22

2.4. AVALIAÇÃO DA SOLUÇÃO DE RESSUSPENSÃO DOS OVOS ..... 22
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 23
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 30
**CAPÍTULO III ..... 31**
***Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (NEMATODA: ENOPLIDA) NO DISTRITO DE SÃO CRISTÓVÃO, TRÊS BARRAS, SANTA CATARINA, BRASIL: hospedeiros paratênicos e infecção experimental em um cão. ..... 31**
1. INTRODUÇÃO ..... 32
2. MATERIAL E MÉTODOS ..... 34
2.1. ÁREA DE ESTUDO ..... 34
2.2. HOSPEDEIROS PARATÊNICOS DE *Dioctophyme renale* ..... 35
2.3. NECROPSIAS ..... 36
2.4. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS ..... 36
2.5. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE HOSPEDEIRO DEFINITIVO ..... 37
2.6. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS, CONTRA ANTÍGENO DE FORMAS ADULTAS DE *Dioctophyme renale,* EM CAMUNDONGOS ..... 39
2.7. EXAME HISTOPATOLÓGICO ..... 39
2.8. TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ) ..... 40
2.9. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM TECIDOS (RIFIT) ..... 41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 42
4. CONCLUSÕES ..... 51
**CAPÍTULO IV ..... 53**
**ANTÍGENO SOMÁTICO DE ESÔFAGO DE HELMINTOS ADULTOS DE *Dioctophyme renale*: ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*D. renale* EM SOROS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS E CARACTERIZAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS PELA TÉCNICA DE "*WESTERN BLOTTING*". ..... 53**
1. INTRODUÇÃO ..... 55
2. MATERIAL E MÉTODOS ..... 56

2.1. PRODUÇÃO DO ANTÍGENO ..... 56
2.2. TÉCNICA DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO ..... 57
2.3. CARACTERIZAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS ..... 60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 64
3.1. TÉCNICA DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO ..... 64
3.2. CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DO ANTÍGENO: SDS-PAGE E "*WESTERN BLOTTING*" ..... 70
4. CONCLUSÕES ..... 82
**CAPÍTULO V ..... 83**
**PARASITISMO POR *Dioctophyme renale* EM CÃES DO DISTRITO DE SÃO CRISTÓVÃO, TRÊS BARRAS, SC: PREVALÊNCIA E FATORES CONDICIONANTES. ..... 83**
1. INTRODUÇÃO ..... 84
2. MATERIAL E MÉTODOS ..... 85
2.1. ÁREA DE ESTUDO ..... 85
2.2. POPULAÇÃO DE CÃES ..... 86
2.3. ANÁLISE DA URINA ..... 87
2.4. EMBRIONAMENTO DOS OVOS ..... 87
2.5. ULTRASSONOGRAFIA ..... 88
2.6. AMOSTRAS DE SORO ..... 88
2.7. TESTE DE ELISA INDIRETO ..... 88
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 90
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 91
4. CONCLUSÕES ..... 104
**CAPÍTULO VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 105**
1. CONCLUSÕES ..... 105
2. PERSPECTIVAS ..... 106
**REFERÊNCIAS ..... 107**
**APÊNDICE ..... 118**

# LISTA DE TABELAS

**Página**

**Tabela 2.1.** Comparativo das dimensões de ovos de *Dioctophyme renale* de diferentes trabalhos publicados. ..... 25

**Tabela 3.1.** Biometria e número de espécimes de cada sexo dos sapos capturados no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, SC, Brasil. ..... 42

**Tabela 3.2.** Medidas em milímetros (média e desvio padrão) de larvas de terceiro estádio de *Dioctophyme renale,* obtidas de *Chaunus ictericus* naturalmente parasitados no período de março de 2007 a fevereiro de 2008, no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, SC, Brasil. ..... 46

**Tabela 4.1.** Comparação dos resultados obtidos com a análise de 94 soros de cães avaliados pelos métodos de sedimentação de ovos do parasito na urina (prova padrão) e ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti–*Dioctophyme renale*. Jaboticabal, SP, 2009..... 68

**Tabela 4.2.** Número de bandas proteicas reconhecidas na pesquisa de anticorpos com antígeno de *Dioctophyme renale* no soro de camundongos e cães pela técnica de "*Western blotting*". ..... 76

**Tabela 4.3.** Frequência das bandas reativas no "*Western blotting*" dos soros dos cães positivos para *Dioctophyme renale* (G1). ..... 77

**Tabela 4.4.** Frequência das bandas reativas no "*Western blotting*" dos soros dos cães negativos pela pesquisa de ovos na urina e positivos pelo exame de ELISA indireto para *Dioctophyme renale* (G2), soros de cães negativos para *D. renale* (G3) e camundongos imunizados e controles (G4)..... 78

**Tabela 5.1.** Descritivo dos caninos parasitados e dos *Dioctophyme renale* removidos. Três Barras – SC, 2009. ..... 94

**Tabela 5.2.** Razão de prevalências para dioctofimatose entre um grupo de cães expostos ou não a fatores considerados de risco para o parasitismo (n=197). Três Barras – SC, 2009. ..... 100

# LISTA DE FIGURAS

**Página**

**Figura 1.1.** Esquema do ciclo evolutivo do *Dioctophyme renale*. ..... 7
**Figura 1.2.** Métodos diagnósticos de dioctofimatose canina. A) Ovos em sedimento urinário (640x). B) Ultrassonografia apresentando cortes transversais do parasito. ..... 16
**Figura 2.1.** Ovos de *Dioctophyme renale* em urinas de cães naturalmente parasitados. ..... 24
**Figura 2.2.** Ovo de *Dioctophyme renale* aos oito dias de incubação com oito células (aumento de 200x). ..... 27
**Figura 2.3.** Tempo *versus* temperatura de incubação para embrionamento de 50% dos ovos de *Dioctophyme renale*. Legenda: Barras correspondem às repetições. ..... 28
**Figura 2.4.** Ovos larvados de *Dioctophyme renale* aos 18 dias de incubação (aumento de 200x). ..... 29
**Figura 2.5.** Percentual de embrionamento de ovos de *Dioctophyme renale* incubados em temperatura de 26ºC, de acordo com o meio utilizado. ..... 30
**Figura 3.1.** Locais de coleta dos Anuros no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina, Brasil. ..... 38
**Figura 4.1.** Fluxograma de procedimentos utilizados para obtenção do antígeno solúvel de esôfago de *Dioctophyme renale*. ..... 58
**Figura 4.2.** Valores de absorbância dos soros controles positivos e negativos para *Dioctophyme renale* nas diversas diluições em função da concentração de antígeno e diluição do conjugado. ..... 65
**Figura 4.3.** Valores de absorbância dos soros controles positivos e negativos para *Dioctophyme renale,* diluídos 1:100 em função da solução de bloqueio e do Tween utilizado. ..... 66
**Figura 4.4.** Valores de absorbância dos soros de cães utilizados na padronização do teste de ELISA indireto, para pesquisa de anticorpos anti-*D. renale*. Jaboticabal, SP, 2009. ..... 69

**Figura 4.5.** Corrida eletroforética do antígeno de esôfago de *Dioctophyme renale,* em gel a 12% de poliacrilamida. Gel corado pelo Comassie Blue. ..... 71
**Figura 4.6.** Ensaio de "*Western blotting*" com soros de camundongos Balb-c (G4). C1 a C3: camundongos imunizados com antígeno de *Dioctophyme renale* (G4a). C4-C6: camundongos não imunizados (controles negativos) (G4b). ..... 75
**Figura 4.7.** Ensaio de "*Western blotting*" com soros de cães naturalmente parasitados com *Dioctophyme renale* e com exame de urina positivo para pesquisa de ovos do parasito (G1). ..... 79
**Figura 4.8.** Ensaio de "*Western blotting*" com soros de cães suspeitos de parasitismo por *Dioctophyme renale*, com exame de urina negativo para pesquisa de ovos do parasito e ELISA indireto positivo (G2). ..... 80
**Figura 4.9.** Ensaio de "*Western blotting*" com soros de cães negativos para *Dioctophyme renale* pelo exame de urina para pesquisa de..... 81
ovos do parasito e pelo ELISA indireto positivo (G3). ..... 81
**Figura 5.1.** Localização geográfica do Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina, Brasil, 2009. ..... 87
**Figura 5.2.** Temperaturas máximas e mínimas (média mensal) do período de janeiro de 2006 a dezembro de 2008, em Três Barras - SC. Nota: Temperaturas destacadas seriam desfavoráveis para o desenvolvimento de ovos de *Dioctophyme renale.* ..... 97
**Figura 5.3.** Locais de observação de cães parasitados no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina, Brasil. ..... 103

## LISTA DE PRANCHAS

**Página**

**PRANCHA I** . ..... 47
**PRANCHA II**. ..... 50
**PRANCHA III** . ..... 50
**PRANCHA IV** ..... 51

# CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

## 1. INTRODUÇÃO

*Dioctophyme renale,* comumente chamado de verme gigante, parasita do rim, é o maior nematódeo conhecido e pode chegar a 100 cm de comprimento por 1,2 cm de diâmetro (MONTEIRO et al., 2002). Tem distribuição mundial e é descrito parasitando carnívoros domésticos e selvagens. A dioctofimatose é considerada uma afecção rara em cães, que acomete principalmente os de vida errante, possivelmente em virtude de hábitos alimentares menos seletivos. Pode, excepcionalmente, acometer bovinos, equinos e suínos. Há também descrição da presença, desse helminto, na pele e nos rins de humanos ocasionando cólicas renais e hematúria (OLIVEIRA et al., 2005; SARDJONO et al., 2008).

No seu ciclo biológico, os ovos são eliminados com a urina do hospedeiro definitivo e evoluem no meio externo. Os animais e humanos adquirem o nematódeo a partir da ingestão de peixes ou anfíbios crus ou mal cozidos e de anelídeos aquáticos infectados com a forma larval. Os parasitos migram para os rins, diretamente através da parede estomacal ou intestinal, acometendo com maior frequência o rim direito, provavelmente devido à sua vizinhança com o duodeno (ANDERSON, 2000). Pode também ser encontrado na cavidade peritoneal, na bexiga, na uretra, no útero, no ovário, na glândula mamária e no estômago do cão e de outros animais (MEASURES, 2001).

É comum ser observado no hospedeiro apenas um helminto, sendo mais raros os casos de alta intensidade de infecção (MONTEIRO et al., 2002).

O diagnóstico dessa afecção é realizado pela pesquisa de ovos na urina e pela radiografia. Porém, como a frequência de casos de parasitismo por *D. renale* em cães sintomáticos é baixa, muitas vezes o diagnóstico é feito apenas na necropsia (ACHA e SZYFRES, 1986; KOMMERS et al., 1999; PEREIRA et al., 2006).

Embora seja considerada uma afecção incomum em cães, no período entre 2000 e 2003, 30% dos 40 cães necropsiados, provenientes do distrito de São Cristóvão, Município de Três Barras – SC, estavam parasitados por *D. renale,* com 91,6% destes animais apresentando um ou mais espécimes apenas no rim direito; e 8,4% com o nematódeo na cavidade abdominal (PEDRASSANI e CAMARGO, 2004).

Estudos relacionados com a morfologia dos ovos, a influência da temperatura no desenvolvimento larval, a presença de larvas em hospedeiros paratênicos, a frequência do parasitismo em cães, e a padronização de técnica sorológica para a detecção de anticorpos da classe IgG, contra antígenos somáticos do parasito, em cães parasitados, se fazem necessários para melhor conhecimento do *D. renale* e da dioctofimatose.

A tese esta dividida em cinco capítulos, neste primeiro foi realizada uma revisão da literatura relativa ao *D. renale* e a dioctofimatose. O segundo capítulo aborda aspectos relativos à morfologia dos ovos do parasito e influência da temperatura no embrionamento desses ovos. No capítulo III é relatada a pesquisa de formas larvais de *Dioctophyme* em hospedeiros paratênicos e a infecção de um cão com larva infectante obtida de hospedeiro paratênico naturalmente parasitado. No capítulo IV estão descritos a produção de antígeno somático do parasito e o uso desse antígeno nas técnicas de ELISA indireta e *western blotting*. Aspectos relativos a fatores que podem favorecer a infecção de cães pelo *D. renale*, bem como a prevalência de ovos do parasito na urina e de anticorpos anti-*D. renale* no soro de cães do Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina foram abordados no capítulo V.

## 2. *Dioctophyme renale* E DIOCTOFIMATOSE

*Dioctophyme renale* Goeze, 1782 (Enoplida: Dioctophymina), é um parasito nematódeo de carnívoros (canídeos e mustelídeos), principalmente aqueles que possuem sua alimentação à base de peixes crus (ANDERSON, 2000; MEASURES, 2001).

Embora o parasito seja conhecido desde 1583, foi apenas descrito por Johann Goeze, em 1782, a partir de exemplares encontrados no rim de um cão (MEASURES, 2001). Após alguns debates sobre o uso de *Dioctophym**e*** Collet-Meygret, 1802 ou *Dioctophym**a*** Bosc, 1803, a Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (1989) pronunciou-se sobre essa questão, proposta por TOLLITT (1987), indicando que o nematódeo deveria ser nominado *Dioctophyme renale.*

O cão é considerado um hospedeiro definitivo anormal e terminal, uma vez que o ciclo de vida do parasito é muitas vezes interrompido (KOMMERS et al., 1999). Nestes, a dioctofimatose é considerada uma afecção rara (FORRESTER e LEES, 1998), que ocorre com maior frequência nos errantes (BRUN et al., 2002).

Os visons (*Mustela vison*) são considerados verdadeiros hospedeiros definitivos e reservatórios do *D. renale* na natureza, devido à presença de grande número de parasitos de ambos os sexos e por localizarem-se geralmente nos rins. Assim, favorecem a liberação de ovos férteis para o meio ambiente e perpetuam o ciclo (OSBORNE et al., 1969).

O parasito possui as extremidades levemente afiladas. Sua boca é hexagonal, sem lábios, com anel cuticular e circundada por seis papilas dispostas em círculo. Sua cutícula é transversalmente estriada e sem espinhos. O esôfago é longo, estreito e claviforme, com discreta dilatação posterior (FREITAS, 1980; URANO et al., 2001).

Sua coloração a fresco é vermelho-sangue. Aducco, em 1889 (citado por DAVENPORT, 1949), observou que a cor vermelha do *D. renale* era devida a um pigmento semelhante à hemoglobina dos vertebrados, extremamente resistente à desoxigenação em vácuo. A presença de hemoglobina em helmintos foi sugerida como evidência de que ela fosse essencial para o fornecimento de oxigênio para os sistemas

oxidativos (DAVENPORT, 1949). Outros autores sugerem que a cor seja devida ao hematofagismo do parasito (COLPO et al., 2007), porém, ao observá-lo em meio de cultivo, ainda apresentava coloração vermelha 30 dias após, sem ter ingerido sangue nesse período (PEDRASSANI et al., 2008b).

O macho apresenta na extremidade posterior uma bolsa espessa, de natureza muscular, em forma de campânula, sem raios bursais e com papilas nas bordas. No centro da bolsa, abre-se o orifício cloacal, de onde emerge o único espículo, com 5 a 6 mm de comprimento (FREITAS, 1980; LEITÃO, 1983). Suas dimensões são, em média, de 14 a 45 cm de comprimento e 4 a 6 mm de largura (FREITAS, 1980; LEVINE, 1978). A fêmea apresenta a extremidade caudal obtusa, ânus terminal, vulva distando de 5 a 7 cm da extremidade anterior e ovário único. Geralmente, suas dimensões são de 20 a 100 cm de comprimento e 5 a 12 mm de largura (LEITÃO, 1983). Os parasitos parecem ser menores em *M. vison* (28 a 60 cm para as fêmeas e 11 a 30 cm para os machos) que nos cães (MEASURES, 2001).

Os ovos são elípticos, com coloração castanho-amarelada, uma parede espessa, rugosa e com um tipo de tampão bipolar. Possuem uma a duas células logo após eliminação na urina e medem 73 a 83 µm de comprimento por 45 a 47 µm de largura (MACE e ANDERSON, 1975; MEASURES, 2001; SLOSS et al., 1999).

## 3. CICLO BIOLÓGICO

O ciclo desse parasito é complexo e incompletamente entendido (KOMMERS et al., 1999). A literatura existente, em sua maioria, é restrita a relatos de casos que, geralmente, não envolvem os aspectos epidemiológicos das infecções.

As formas adultas de *D. renale* são encontradas nos rins dos hospedeiros definitivos. As fêmeas maduras depositam ovos, que são eliminados com a urina dos hospedeiros (MACE e ANDERSON, 1975) e se desenvolvem em ambiente aquático. As larvas de primeiro estádio (L1) são observadas no interior dos ovos em aproximadamente 35 dias, em temperatura de 20$^{o}$C, sendo essa a forma infectante

para o anelídeo oligochaeta aquático, *Lumbriculus variegatus,* que é o hospedeiro intermediário. A muda do primeiro estádio para o segundo ocorre no vaso sanguíneo ventral do anelídeo, 50 dias após a infecção, e a muda para a forma infectante, larva de terceiro estádio (L3), cerca de 100 dias após a infecção, quando os anelídeos são mantidos em temperatura de 20$^{o}$C (MACE e ANDERSON, 1975). A larva L3 retém as cutículas do primeiro e segundo estádio (MEASURES, 2001).

As L3 presentes nos oligochaetas são infectantes para os hospedeiros definitivos e também para os paratênicos, como peixes e anuros (MACE e ANDERSON; 1975; MEASURES e ANDERSON, 1985) (Figura 1). As larvas não evoluem nos hospedeiros paratênicos, permanecendo encapsuladas principalmente na musculatura abdominal, na parede do estômago e no mesentério (ANDERSON, 2000; MACE e ANDERSON, 1975; MEASURES e ANDERSON, 1985).

Karmanova, em 1968 (citado por MEASURES, 2001), observou de uma a 12 larvas em várias espécies de peixes. MACE e ANDERSON (1975) examinaram quatro espécies de anuros (*Rana catesbeiana, R. clamitans melanota, R. septentrionalis, R. pipens*) e encontraram 5,6% de infectados entre 504 examinados, com intensidade média de 1,6 larva por animal infectado.

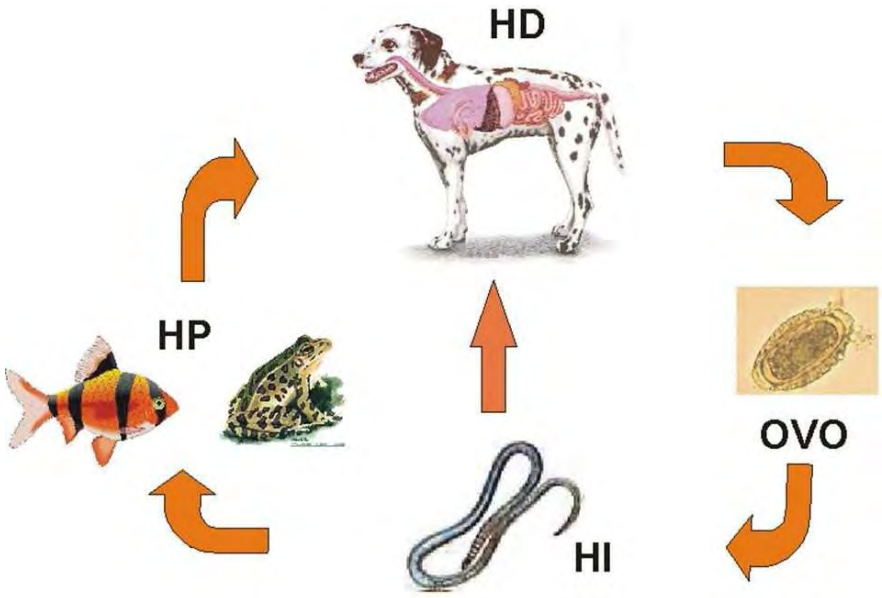
MEASURES e ANDERSON (1985) observaram larvas predominantemente na musculatura hipaxial de peixes (*Lepomis gibbosus*), com prevalência de 5% a 23% e com intensidade média de uma a duas larvas por peixe.

Larvas L3 oriundas de hospedeiros intermediários ou paratênicos ingeridos por hospedeiros definitivos penetram na parede do estômago e realizam muda para o quarto estádio larvar (L4) em cinco dias após a ingestão (MACE e ANDERSON, 1975).

Lesões no fígado sugerem que as larvas passam através deste antes de entrarem no rim direito ou na cavidade abdominal. Segundo Karmanova, em 1968 (citado por MEASURES, 2001), a última muda ocorre na cavidade abdominal do hospedeiro. Ovos depositados no rim do hospedeiro são passados com a urina pelo ureter, que usualmente permanece funcional, e atingem o meio externo, porém aqueles depositados por fêmeas maduras na cavidade abdominal não saem do hospedeiro (MEASURES, 2001) (Figura 1.1).

A rota migratória de larvas de *D. renale*, do estômago até o rim (normalmente o direito), já foi objeto de diversas teorias. Segundo HALLBERG (1953), a larva penetra na parede do duodeno e passa para a cavidade abdominal antes de entrar, como adulto, no rim direito. Já, em infecção experimental, MACE e ANDERSON (1975) verificaram que a larva penetra na parede estomacal e passa através do fígado e da cavidade abdominal antes de entrar, como adulto, no rim direito. Características anatômicas do hospedeiro podem influenciar na rota migratória. Em *M. vison,* o estômago, o lobo direito do fígado, a primeira porção do duodeno e o rim direito são muito próximos. HALLBERG (1953) e MACE e ANDERSON (1975) postulam que essa proximidade pode contribuir para o fato de 85% das infecções nesta espécie envolverem o rim direito. Nos cães, esses mesmos órgãos estão menos próximos. Esse fator talvez contribua para uma maior percentagem de *D. renale* na cavidade abdominal em cães, quando comparados com *M. vison* (HALLBERG, 1953). FERREIRA NETO et al. (1972) sugeriram que o rim direito pode ser o mais acometido, por tropismo do próprio parasito.

O período pré-patente é de 135 dias, em cães, e 154 dias em *M. vison* (MACE e ANDERSON, 1975). Para ACHA e SZYFRES (1986), esse período é de três meses e meio a seis meses. A longevidade deste parasito, bem como o período de patência no hospedeiro definitivo, são desconhecidos. Entretanto Karmanova, em 1968 (citado por MEASURES, 2001), relatou que este parasito pode sobreviver por três a cinco anos no hospedeiro definitivo.




**Legenda:** HD = Hospedeiro Definitivo, HI = Hospedeiro Intermediário, HP = Hospedeiro Paratênico

**Figura 1.1.** Esquema do ciclo evolutivo do *Dioctophyme renale*.

## 4. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E OCORRÊNCIA

A dioctofimatose foi registrada em diversos países, tais como Canadá, Estados Unidos, México, Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina, França, Holanda, Alemanha, Bulgária, Romênia, Itália, Polônia, países da antiga URSS, Irã, Afeganistão, Índia, Vietnã, Tailândia, China e Japão (MEASURES, 2001). Não há relatos deste parasito na África e na Oceania (ACHA e ZYFRES, 1986; MEASURES, 2001).

O parasito, provavelmente, originou-se no holártico e dispersou-se para outras partes do mundo pela translocação de hospedeiros (especialmente cães) ou pela alimentação de hospedeiros definitivos suscetíveis com hospedeiros paratênicos infectados provenientes de áreas enzoóticas (MEASURES, 2001).

Conforme NEVES et al. (1983), no Brasil, a dioctofimatose, também conhecida por dioctofimíase, foi descrita pela primeira vez, em 1860, por Molin, em um lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). SCHMIDT (1924) registrou a sua ocorrência em Porto Alegre,

e, ainda, MONTEIRO (1934) registrou o terceiro caso de parasitismo por este helminto, no Rio de Janeiro, em um cão trazido da Bélgica. Desde então, vários casos vêm sendo relatados em vários estados do Brasil, como Espírito Santo (BARROS, 1971; PEREIRA et al., 2006), Goiás, Minas Gerais (COSTA e FREITAS, 1967; COSTA e LIMA, 1988; POPPI et al., 2004), Pará (GALVÃO et al., 1999; MIRANDA et al., 1992), Paraná (LEITE et al., 2005), Rio Grande do Sul (BRANGEL et al., 1976/7; MONTEIRO et al., 2002), Rio de Janeiro (MATTOS JÚNIOR e PINHEIRO, 1994), Santa Catarina (PEDRASSANI e CAMARGO, 2004; NEVES et al., 1983), São Paulo (AUGUSTO FILHO et al., 1999), Amazonas (ROCHA et al., 1965), Pernambuco e Bahia (AMATO et al., 1976; KOMMERS et al., 1999).

## 5. HOSPEDEIROS

### 5.1. HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS

Os hospedeiros intermediários são oligochaetas aquáticos, com somente uma espécie, *L. variegatus*, sendo natural e experimentalmente observada com larvas de *D. renale* (MACE e ANDERSON, 1975). As observações de WOODHEAD (1950) de que oligochaetas da família Branchiobdelidae, ectoparasitos de camarão-de-água-doce, fossem os hospedeiros intermediários foi desacreditada (MACE e ANDERSON, 1975; MEASURES, 2001).

*Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta: Lumbriculida) é de distribuição holártica e foi introduzido em países do Hemisfério Sul (África do Sul, Austrália e Nova Zelândia). É encontrado na América do Norte e na Europa e habita o sedimento do fundo de rios e lagos de água doce. Seu tamanho varia de 4 a 10 cm de comprimento, com 1,5 milímetros de diâmetro (DREWES e BRINKHURST, 1990). Embora seja relatada a ausência de *L. variegatus* na América do Sul e no Brasil, o *D. renale* é encontrado, com

frequência, em animais, especialmente cães, indicando que outro oligochaeta deva servir como hospedeiro intermediário do parasito nesta região.

## 5.2. HOSPEDEIROS DEFINITIVOS

Os hospedeiros definitivos incluem os Mustelidae, como vison (*Mustela vison),* marta (*Martes americana*) e lontra (*Lutra lutra*); os Canidae, como coiote (*Canis latrans),* lobo (*C. lupus*)*,* cão (*C. familiaris),* lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*)*,* cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*)*,* raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*); e os Procyonidae, como guaxinim (*Procyon lotor*) e quati (*Nasua nasua*) (KOMMERS et al., 1999; MEASURES, 2001). No Brasil, o parasitismo em hospedeiros definitivos foi descrito em cão (*C. familiaris)*, cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), mão-pelada (*Procyon cancrivorous*), quati (*Nasua nasua*), furão (*Galictis cuja*) (BARROS et al., 1990), lontra *(Lutra longicaudis*), bicho-preguiça (*Choloepus didactylus*) (GRECHI, 1965) e lobo-guará (*Chrysocyon brachiurus*) (CARNEIRO et al., 2008; LEITE et al., 2005; PESENTI et al., 2007; REIS et al., 2006; ROCHA e GRECHI, 1965).

Os registros de parasitismo em lobo-guará, no Brasil, revelam alta frequência, o que leva a pensar que se trate de excelente hospedeiro e que, considerados os seus hábitos alimentares e migratórios, deve desempenhar papel mais importante na cadeia epidemiológica que o cão (COSTA e LIMA, 1988; LEITE et al., 2005).

Para KOMMERS et al. (1999) cães são considerados hospedeiros definitivos anormais e terminais, uma vez que o ciclo de vida do parasito é interrompido, pelo fato da maioria dos animais apresentar parasitismo único. Os visons são considerados hospedeiros definitivos e reservatórios de *D. renale* na natureza, devido à presença de grande número de parasitos de ambos os sexos e por esses localizarem-se geralmente nos rins, favorecendo a liberação de ovos férteis para o meio ambiente, perpetuando o ciclo (OSBORNE et al*.,* 1969; BARRIGA, 1982).

Hospedeiros definitivos ocasionais incluem bovinos, equinos, suínos, humanos (MEASURES, 2001) e felinos (MOMO et al., 2008).

A predominância de *D. renale* no rim direito foi descrita por diversos pesquisadores brasileiros: NEVES et al. (1983), COSTA e LIMA (1988), MARQUES et al. (1999) e TORRES et al. (2001).

As infecções podem ser únicas; quando múltiplas, podem envolver helmintos de um único sexo ou de ambos (MEASURES, 2001). Menos de 1% das infecções envolvem os dois rins em *M. vison* (MEASURES, 2001).

Localizações pouco frequentes do *D. renale* adulto são: rim esquerdo (GALVÃO et al., 1999), linfonodo mesentérico, cavidade torácica (NEVES et al., 1983), bexiga, uretra, bolsa escrotal, tecido subcutâneo inguinal, útero, ovário, glândula mamária e pericárdio (ALVARENGA et al., 1984; BARRIGA, 1982; BARROS, 1971; FREIRE, 1979; MATTOS JÚNIOR e PINHEIRO, 1994; MIRANDA et al., 1992; NEVES et al., 1983; OSBORNE et al., 1969). O parasito pode, também, penetrar no ureter e sair para o exterior através da uretra, perfurar a cápsula renal e permanecer na cavidade abdominal (ANDERSON, 1986) ou atravessar a parede abdominal (BARRIGA, 1982). Na Argentina, APREA et al. (2004) relataram um caso de *D. renale* parasitando o pulmão de um cão de dois anos de idade.

Recentemente, COSTA et al. (2004) concluíram que a dioctofimatose ocorre preferencialmente em cães errantes, com hábitos alimentares pouco seletivos. A possibilidade de transmissão, ao longo da cadeia alimentar dos hospedeiros paratênicos e definitivos, permite que se questionem outras fontes de infecção para cães, principalmente para os animais que perambulam pelas ruas, alimentando-se do que estiver disponível nos locais por onde passam.

## 5.3. HOSPEDEIROS PARATÊNICOS

Os hospedeiros paratênicos incluem sapos e rãs *(Rana catesbeiana, R. clamitans melanota, R. septentrionalis, R. ridibunda*) e peixes de água doce (*Pseudoscaphirynchus kaufmanni, Ictalurus nebulosus, I. melas, Esox lucius, Leuciscus idus, Aspius aspius, Rutilus rutilus, Chalcalburnus chalcoides, Pelecus cultratus, Barbus*

*branchicephalus, Gobio gobio, Alburnoides taeniatus, Perca fluviatilis, Silurus glanis, Gambusia affinis, Lepomis gibbosus, L. cyanellus* e *Micropterus salmoides*) (MACE e ANDERSON, 1975; MEASURES, 2001; MEASURES e ANDERSON, 1985).

Ainda que o *D. renale* seja amplamente distribuído, ele ocorre somente em áreas enzoóticas localizadas, onde a prevalência entre os hospedeiros varia de ano para ano (MEASURES, 2001).

## 6. LIMITAÇÕES AMBIENTAIS

Diversos hábitats são necessários para o desenvolvimento de cada uma das fases de vida: 1$^{o}$) um hospedeiro definitivo, ou seja, um mamífero vertebrado, geralmente carnívoro; 2$^{o}$) um meio aquático onde os ovos embrionam; 3$^{o}$) um hospedeiro intermediário, invertebrado de vida livre; e 4$^{o}$) hospedeiros paratênicos (ANDERSON, 2000).

O desenvolvimento dos ovos no ambiente externo e o desenvolvimento das larvas nos oligochaetas são dependentes da temperatura. As L1 se desenvolvem em 15 a 102 dias, quando os ovos são mantidos em água bem oxigenada e incubados em temperaturas entre 14$^{o}$C e 30$^{o}$C. Ovos em desenvolvimento e os já embrionados não sobrevivem à dessecação, ao congelamento e a altas temperaturas e não se desenvolvem em temperaturas inferiores a 10$^{o}$C, entretanto podem retomar o desenvolvimento se a temperatura aumentar para 14$^{o}$C (MACE e ANDERSON, 1975).

As L3 se desenvolvem em 70 a 159 dias no vaso sanguíneo ventral dos oligochaetas infectados, sendo o desenvolvimento mais lento quando o parasitismo é superior a quatro larvas (MACE e ANDERSON, 1975).

Uma vez que os ovos de *D. renale* são intolerantes a baixas temperaturas, a infecção dos oligochaetas, em regiões de clima temperado, provavelmente, ocorre apenas a partir da primavera até o verão, período no qual a temperatura da água é superior a 14$^{o}$C. Em latitudes como a da América do Sul, a transmissão, provavelmente, ocorre ao longo do ano (MEASURES, 2001).

O aparecimento de casos de dioctofimatose em animais pode estar relacionado ao alto potencial hídrico de algumas regiões, o que favorece o acesso aos hospedeiros paratênicos ou intermediários ao nematódeo (PEREIRA et al., 2006).

## 7. PATOGENIA

As migrações dos helmintos causam hepatite crônica persistente, principalmente do lobo direito do fígado, e reações inflamatórias crônicas proliferativas no peritônio (MEASURES, 2001). Esses danos causam graves distúrbios funcionais, daí a importância de sua patogenicidade (SANT'ANA e REBOUÇAS, 1974).

As infecções quase sempre resultam em total destruição do parênquima renal, com atrofia e fibrose dos túbulos renais, fibrose periglomerular, além de espessamento da cápsula renal, contendo no interior os parasitos em meio a líquido sanguinopurulento, rico em hemácias, ovos do parasito, leucócitos e células degeneradas (MEASURES, 2001).

OSBORNE et al. (1969) notificaram a peritonite, que ocorre nos casos em que há ruptura de órgãos por ação de enzimas liberadas pelo nematódeo. Em caso de perfuração de órgãos, pode haver hemoperitônio, peritonite, aderência e lesão na superfície do fígado (DACORSO FILHO et al., 1954; GARGILI et al., 2002). A presença de fêmeas de *D. renale* na cavidade abdominal pode ser acompanhada pela presença de grande quantidade de ovos, os quais também contribuem para a peritonite (ANDERSON, 2000).

As lesões macroscópicas dependem da localização dos parasitos. No parasitismo renal, o parênquima encontra-se destruído e atrofiado, associado a acentuada dilatação da pelve. Enzimas proteolíticas e lipolíticas, liberadas pelas glândulas esofágicas do parasito, determinam necrose de coagulação nos locais atingidos (AUGUSTO FILHO et al.,1999; NEVES et al., 1983; OSBORNE et al., 1969) e possibilitam a penetração e a destruição do parênquima renal, restando apenas a

cápsula como uma bolsa repleta de fluido necro-hemorrágico, contendo ovos, se o rim estiver parasitado por fêmeas do nematódeo (ANDERSON, 2000; LOW, 1995).

Normalmente, o ureter é funcional, mas, em alguns casos, parasitos localizados na pelve renal podem bloquear o ureter, resultando em hidronefrose (MEASURES, 2001). A alimentação do parasito é pela digestão e ingestão do parênquima renal e do sangue que flui das lesões que ele causa nos órgãos (CORRÊA, 1973). Histologicamente, o parênquima renal se apresenta delgado e obliterado por tecido conjuntivo fibroso, associado a infiltrado inflamatório mononuclear intersticial, com atrofia acentuada e perda de glomérulos e túbulos. Pode ocorrer hiperplasia do epitélio de transição da pelve. Em alguns casos, ocorre hipertrofia renal compensatória contralateral (KOMMERS et al., 1999). A severidade da lesão renal depende do número de parasitas que afetam o rim, da duração da infecção, do número de rins envolvidos e da presença ou ausência de doença renal concomitante (FREIRE et al., 2002).

Dependendo do grau de acometimento renal, esse parasitismo causa destruição progressiva das camadas cortical e medular e pode reduzir o órgão a uma cápsula fibrosa. A maioria dos animais infectados apresenta hipertrofia compensatória do rim esquerdo (DACORSO FILHO et al., 1954; PACHECO et al., 1965; MIGLIANO e MATERA, 1966; BARRIGA, 1982; NEVES et al., 1983; ACHA e SZYFRES, 1986).

Existem relatos de casos com alto grau de parasitismo, por exemplo, o de MONTEIRO et al. (2002), no qual um cão encontrava-se parasitado por trinta e quatro exemplares de *D. renale,* estando livres vinte e sete exemplares na cavidade abdominal e sete no interior do rim direito.

## 8. SINAIS CLÍNICOS

Cães afetados pelo *D. renale* geralmente são assintomáticos (OSBORNE et al., 1969; BARRIGA, 1982; COPPO e BREM, 1983; LOW, 1995).

Após infecções experimentais alimentando visons, furões e cães com larvas infectantes do parasito, foram observados agitação e vômitos, presumivelmente por

causa da invasão da parede estomacal pelas larvas (MACE e ANDERSON, 1975; MEASURES, 2001; MEASURES e ANDERSON, 1985).

Os sinais clínicos, quando presentes, podem incluir fraqueza, relutância em caminhar (AUGUSTO FILHO et al., 1999; URQUHART et al., 1998), maior frequência de micção, anorexia (FORTES, 2004; GALVÃO et al., 1999), convulsões (CORRÊA, 1973), ascite, cólicas abdominais, perda de peso, disúria e irritabilidade.

Alguns animais apresentam manifestações clínicas relacionadas com peritonite ou com uremia, em virtude da insuficiência renal (OSBORNE et al., 1969). Quando o parasito se localiza no rim, o hospedeiro pode apresentar arqueamento dorsal, dores violentas, hematúria e estrangúria. Quando a localização é na cavidade abdominal, os sinais clínicos podem ser inaparentes. As alterações variam segundo a localização, o grau de desenvolvimento do parasito e a reação dos tecidos lesados, bem como a espécie parasitada (DACORSO FILHO et al., 1954).

Os exames laboratoriais podem indicar anemia, hematúria, piúria, proteinúria, poliúria, uremia e insuficiência renal (MACE e ANDERSON, 1975; MEASURES e ANDERSON, 1985).

## 9. MEIOS DIAGNÓSTICOS

Os principais métodos diagnósticos descritos na literatura são o achado de ovos do parasito na urina e a radiografia (COSTA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2002).

Características morfológicas, como o tamanho, a coloração e a localização, em rim ou cavidade abdominal, de nematódeos observados em necropsias, cirurgias ou que são eliminados pelas vias urinárias, permitem a identificação de *D. renale* (ANDERSON, 2000; MEASURES, 2001).

No exame do sedimento urinário, podem ser observados os ovos típicos (Figura 1.2). Ovos podem também ser verificados no líquido ascítico e no conteúdo pio-hemorrágico renal, detectados por laparotomia ou aspiração de ovos do líquido de rim ou cavidade abdominal (MEASURES, 2001).

Exames hematológicos e bioquímicos devem ser realizados. O rim é o órgão responsável pela produção de eritropoetina (GUYTON e HALL, 1997), que é o fator estimulante para a produção de eritrócitos na medula óssea (GARCIA-NAVARRO, 2005). Quando o parênquima renal é funcional, a hipóxia no rim causa aumento na produção de eritropoetina, que, por sua vez, acelera a produção de hemácias na medula óssea até minimizar a hipóxia. Na ausência da eritropoetina, a hipóxia tem pouco ou nenhum efeito na estimulação da produção de hemácias (GUYTON e HALL, 1997; GARCIA-NAVARRO, 2005). Em um animal normal, 90% da eritropoetina é produzida nos rins, o restante é formado principalmente no fígado. Quando há a retirada ou a destruição dos rins, como pode ocorrer com a dioctofimatose renal, o animal pode se tornar anêmico (AUGUSTO FILHO et al., 1999), pois 10% da eritropoetina formada nos outros tecidos (fígado principalmente) são capazes de estimular somente um terço ou metade da produção de hemácias, na medula óssea, necessárias ao organismo (GUYTON e HALL, 1997). Por essa razão, é necessário que se realize um hemograma para verificar se o cão está com anemia causada pela destruição do parênquima renal.

Outros dois importantes exames são as provas de bioquímica sérica de função renal, ureia e creatinina. A uréia e a creatinina são os produtos finais do metabolismo das proteínas e eles têm de ser removidos do corpo para garantir a continuação do metabolismo proteico normal nas células (GUYTON e HALL, 1997). A ureia é formada no fígado e representa o principal produto do catabolismo das proteínas na espécie carnívora. A uréia passa através do filtro glomerular e cerca de 25% a 40% dela é reabsorvida quando passa pelos túbulos (MEYER et al., 1995). A creatinina é formada durante o metabolismo da musculatura esquelética, passa pela filtração glomerular e deve ser totalmente eliminada pela urina. Uma severa perda muscular poderá reduzir a quantidade de creatinina formada (MEYER et al., 1995). Uma redução na taxa de filtração glomerular aumenta a concentração sérica de creatinina e uréia. Por essa razão, a medida da concentração dessas substâncias fornece um meio para avaliar o grau de insuficiência renal (GUYTON e HALL, 1997).

Na dioctofimatose, a radiografia e a ultrassonografia da região abdominal são importantes, pois permitem identificar alterações no trato urinário e nos outros órgãos. Ocasionalmente, o *D. renale* adulto pode ser visualizado nesses exames.

A radiografia e a urografia excretora proporcionam informações precisas acerca das dimensões renais, podendo, assim, revelar a presença de um rim hipertrofiado ou a dificuldade do rim parasitado em eliminar a substância contrastante (MEASURES, 2001).

A ultrassonografia em corte transversal dos rins é um método que pode sugerir a presença do *D. renale* no parênquima renal, pela visualização da arquitetura anatômica do rim parasitado, que pode se apresentar distorcida, e pela detecção de estruturas arredondadas, com uma fina camada externa hiperecoica e centro hipoecoico, não apresentando estruturas que caracterizem um rim (Figura 1.2). No rim oposto ao parasitado, pode-se observar um aumento de volume (COSTA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

Larvas similares àquelas de terceiro estádio de *D. renale* têm sido descritas a partir de nódulos subcutâneos de seres humanos (GUTIERREZ et al., 1989; URANO et al., 2001). A identificação de larvas de *D. renale*, principalmente quanto à histologia, é problemática, uma vez que podem ser confundidas com larvas de *Eustrongylides* spp. Já os caracteres morfológicos permitem a distinção entre larvas de *Eustrongylides* spp. e *Dioctophyme* spp. (MEASURES, 2001).

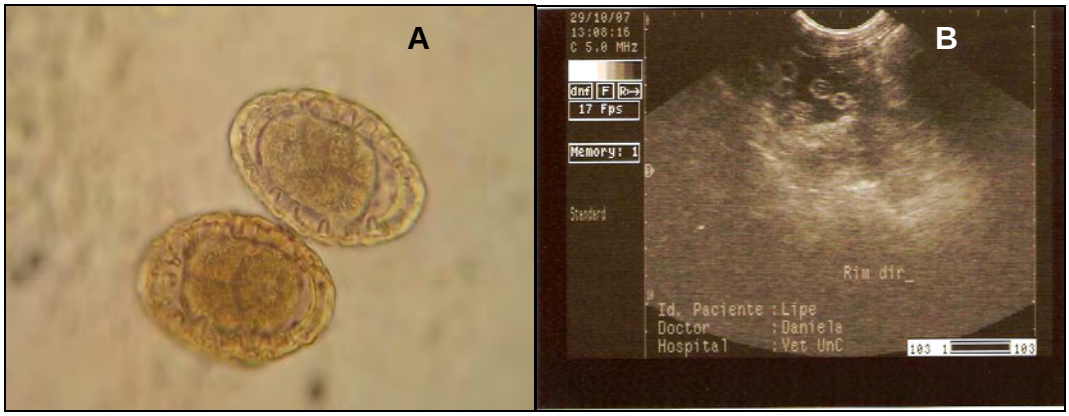



**Figura 1.2.** Métodos diagnósticos de dioctofimatose canina. A) Ovos em sedimento urinário (640x). B) Ultrassonografia apresentando cortes transversais do parasito.

## 10. IMUNIDADE

Não existem dados relativos ao fato de os hospedeiros desenvolverem imunidade contra o *D. renale*. Entretanto, infecções naturais e experimentais sugerem que os hospedeiros são infectados somente uma vez (HALLBERG, 1953). Nas infecções que envolvem mais de um helminto, eles sempre estão no mesmo estágio de desenvolvimento (HALLBERG, 1953, MACE e ANDERSON, 1975). Porém, MONTEIRO et al. (2002), em necropsia, encontraram livres na cavidade abdominal, vinte e oito exemplares, sendo dezoito adultos (machos e fêmeas) e dez imaturos.

PEDRASSANI et al. (2008a) avaliaram o dot-ELISA com antígeno de formas adultas do parasito para a detecção de anticorpos IgG anti-*D. renale* em soros de cães do Município de Três Barras, Santa Catarina. De 32 soros testados, 21 eram de animais que apresentavam ovos do parasito na urina e 11 de animais com exames negativos de urina. Quando comparado ao exame de urina (padrão-ouro), o dot-ELISA apresentou 95,2% de co-positividade e 90,9% de co-negatividade, demonstrando que esse método pode ser usado para detecção de anticorpos específicos contra *D. renale* no soro de cães suspeitos ou em estudos epidemiológicos.

## 11. CONTROLE E TRATAMENTO

O método de controle sugerido é evitar o consumo de peixes, rãs e sapos crus ou insuficientemente cozidos, especialmente em áreas que são enzoóticas para *D. renale* (ACHA e SZYFRES, 1986; MEASURES, 2001). Porém, em se tratando de animais com acesso às ruas, essas medidas tornam-se pouco efetivas.

Quanto ao tratamento, os anti-helmínticos que possuem excreção renal, como o thiabendazole, eliminam metabólitos sem atividade anti-helmíntica, porque apresentam baixa afinidade pela união com a β-tubulina de nematódeos, além disso, têm rápida excreção urinária, o que dificulta sua penetração na cutícula dos helmintos (LANUSSE,

2009[1]). Mesmo que este parasito fosse morto pela ação de anti-helmínticos, não seria facilmente eliminado do rim, devido a sua espessura e seu tamanho. Dessa forma, o tratamento indicado é cirúrgico, pela nefrectomia do rim parasitado (CORRÊA, 1973; MEASURES, 2001), tendo-se feito adequada avaliação de função renal do rim oposto (OLIVEIRA et al., 2005).

## 12. IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

A infecção de humanos está associada à ingestão de peixes ou rãs mal cozidos (BARRIGA, 1982; BROWN e PRESTWOOD, 1988). Diversos casos de dioctofimatose humana têm registros na literatura (ACHA e SZYFRES, 1986; GUTIERREZ et al., 1989; HANJAN et al., 1968, IGNJATOVIC et al., 2003, URANO et al., 2001), sendo essa afecção considerada zoonótica. Entretanto, é necessário sempre lembrar que tanto larvas de *Eustrongylides* quanto larvas de *Dioctophyme* são transmitidas ao ser humano pelo consumo de peixes e rãs crus ou mal cozidos, sendo necessária a sua diferenciação (MEASURES, 2001). Embora a maioria dos peixes destinados ao consumo humano seja eviscerada, a descoberta de larvas de terceiro estádio de *D. renale* em musculatura de peixes indica o risco potencial para os consumidores (MEASURES e ANDERSON, 1985).

[1] Comunicação pessoal por correio eletrônico

**CAPÍTULO II**

# MORFOLOGIA DE OVOS DE *Dioctophyme renale* Goeze, 1782 (Nematoda: Dioctophymatidae) E INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁDIO NOS OVOS[2].

# MORPHOLOGY OF EGGS OF *Dioctophyme renale* Goeze, 1782 (Nematoda: Dioctophymatidae) AND INFLUENCES OF TEMPERATURE ON DEVELOPMENT OF FIRST-STAGE LARVAE IN THE EGGS.

**RESUMO** - Este estudo teve a finalidade de fornecer dados morfológicos de ovos de *D. renale* e do desenvolvimento de larvas de primeiro estádio em ovos mantidos em diferentes temperaturas. Os ovos foram obtidos por centrifugação da urina de cães parasitados e colocados em placas de Petri, em estufa BOD, durante 90 dias. O experimento consistiu de três tratamentos (GI-15ºC, GII-20ºC e GIII-26ºC) com cinco repetições cada. Os ovos apresentaram tamanho médio de 67,23 X 42,78 μm, e o tempo médio de incubação foi inversamente proporcional à temperatura de incubação. As larvas apresentaram motilidade por aproximadamente uma semana após sua formação.

**Palavras-chave:** *Dioctophyme renale,* cão, ovos, temperatura.

[2] PEDRASSANI, D.; HOPPE, E. G. L., AVANCINI, N., NASCIMENTO, A. A.. Morphology of eggs of *Dioctophyme renale* Goeze, 1782 (Nematoda: Dioctophymatidae) and influences of temperature on development of first-stage larvae in the eggs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 15-19, 2009.

**ABSTRACT** - This study aims to provide information on morphological data of *D. renale* eggs, as well as on first-stage larvae development into eggs kept at different temperatures. Eggs were obtained by centrifugation of infected dog urine, placed in Petri dishes, and stored in BOD chamber for a 90-day period. Each treatment (GI-15ºC, GII-20ºC, and GIII-26ºC) was repeated five times. Eggs showed average measures of 67.23 x 42.78 μm, and the mean incubation time was inversely proportional to the incubation temperature. Larvae motility was observed one week after being observed in eggs.

**Key words:** *Dioctophyme renale,* dog, eggs, temperature.

## 1. INTRODUÇÃO

*Dioctophyme renale* Goeze, 1782 (Enoplida: Dioctophymatoidea), comumente chamado de verme gigante que parasita o rim, é o maior nematódeo conhecido, podendo chegar a 100 cm de comprimento por 1,2 cm de largura (ANDERSON, 2000; MONTEIRO et al., 2002; FORTES, 2004).

Sua distribuição é mundial e é descrito parasitando mustelídeos e carnívoros domésticos e selvagens (ANDERSON, 2000; COSTA et al., 2004). *Mustela vison* (Carnivora: Mustelidae) é considerado o principal hospedeiro definitivo (BOWMAN, 2006). Para alguns autores (KOMMERS et al., 1999; NAKAGAWA et al., 2007), o cão é considerado um hospedeiro definitivo anormal e terminal ou acidental (ACHA e SZYFRES, 1986).

No ciclo do parasito, os ovos são eliminados com a urina do hospedeiro definitivo, e sua evolução ocorre no meio externo (ANDERSON, 2000). Os ovos são de coloração castanha, elípticos, possuem uma casca espessa e ondulada e tampões bipolares (SLOSS et al., 1999).

Os ovos de *D. renale* tornam-se inviáveis quando são dessecados pelo sol (Lukasiak, 1930 citado por COYNER et al., 2004). A evolução no interior dos ovos ocorre apenas se estes entrarem em contato com a água de rios e se no rio houver o

anelídeo oligochaeta *Lumbriculus variegatus*. Este anelídeo funciona como hospedeiro intermediário do parasito; nele as larvas atingem o estádio infectante, a larva de terceiro estádio (ANDERSON, 2000). O principal método de diagnóstico é o achado de ovos na urina (COSTA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2002). Desse modo, torna-se importante o conhecimento da morfologia destes ovos.

Para melhor compreender aspectos da biologia e morfologia de formas pré-parasitárias de *D. renale,* no Brasil, este experimento foi conduzido para fornecer dados morfológicos dos ovos e estudar a influência da temperatura no desenvolvimento do primeiro estádio larval nos ovos do parasito.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. OBTENÇÃO DOS OVOS DE *Dioctophyme renale*.

Para a obtenção de ovos de *D. renale,* foram realizadas cinco colheitas de 10 mL de urina de cada um dos nove cães positivos, provenientes de Três Barras, Santa Catarina. As urinas foram obtidas por cateterismo vesical ou cistocentese guiada por ultrassom e, a seguir, foram centrifugadas a 400 xg, por 10 minutos, para concentração dos ovos. Em seguida, foram lavados em solução salina 0,9% e submetidos por três vezes a centrifugação a 400 xg, por 10 minutos cada, descartando-se o sobrenadante.

### 2.2. AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Para determinar o comprimento e a largura, foram medidos 102 ovos provenientes de nove cães parasitados. Para cada ovo foi anotado o maior comprimento e a maior largura. As medidas de comprimento e largura dos ovos (em μm) foram obtidas e analisadas com o programa ImagePro Plus versão 4.1, apropriado

para medições de parasitos, e as imagens dos ovos foram captadas pelo microscópio trinocular Olympus BX-51, equipado com câmera digital QColor 3, com 3,1 mega pixels de resolução.

## 2.3. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA

Para verificar o percentual de embrionamento, os ovos foram ressuspensos em 3 mL de água mineral, em placas de Petri, e mantidos por 90 dias em estufa BOD com fotoperíodo e umidade de aproximadamente 80%. A seguir, foram distribuídos em três grupos com cinco repetições cada: GI – temperatura de 15$^{o}$C (± 0,5$^{o}$C), GII - temperatura de 20$^{o}$C (± 0,5$^{o}$C) e GIII - temperatura de 26$^{o}$C (± 0,5$^{o}$C). A água mineral utilizada era do tipo alcalino-terrosa e fluoretada com pH variando de 7,2 a 7,7. Para monitoramento do material, a cada 2-3 dias, foi efetuada uma análise das placas em microscópio óptico, com aumento de 400 vezes, observando-se o percentual de ovos larvados, contaminação fúngica e bacteriana e a viabilidade dos ovos.

## 2.4. AVALIAÇÃO DA SOLUÇÃO DE RESSUSPENSÃO DOS OVOS

Para essa análise, os ovos foram ressuspensos em placas de Petri e incubados em estufa BOD, em temperatura de 26$^{o}$C, por 30 dias. Foram determinados dois tratamentos: T1 - sedimento ressuspenso em água mineral (pH=7,2); e T2 - sedimento ressuspenso em solução de água ultra-purificada milliQ® com 0,1% de formalina (pH=7,0). Para cada tratamento foram realizadas seis repetições. A cada 2-3 dias, foi efetuada análise das placas em microscópio óptico, com aumento de 400 vezes, observando-se o percentual de ovos larvados, contaminação fúngica e bacteriana e a viabilidade dos ovos.

## 2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As dimensões dos ovos que desenvolveram ou não larvas, bem como o tempo para embrionamento de 50% deles, foram avaliados estatisticamente pelo teste t de Student ($\alpha$=0,05) pelo programa estatístico MSTAT – C versão 2.10.

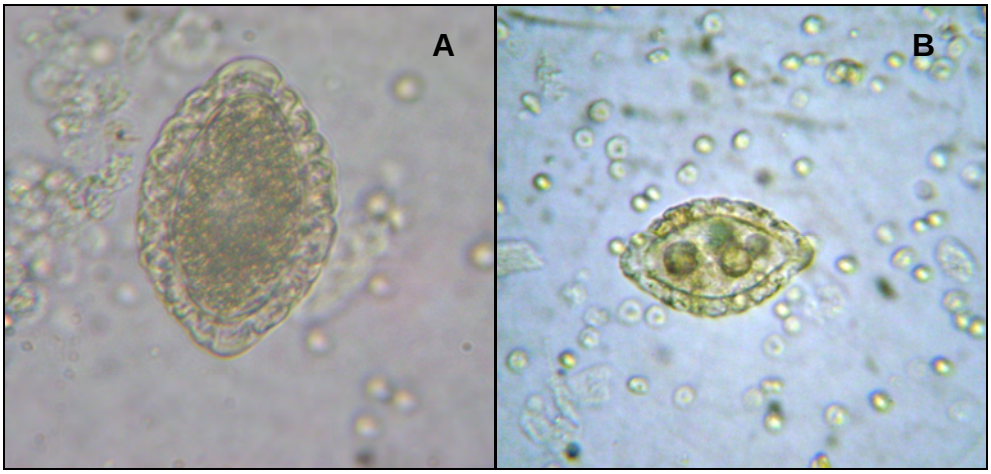
A avaliação da solução para o embrionamento foi realizada pelo teste t de Student ($\alpha$=0,05) pelo programa estatístico MSTAT – C versão 2.10, com os dados transformados em Log (valor+1).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ovos apresentavam formato elipsoidal, com extremidades polares geralmente simétricas e cobertos por uma casca espessa e rugosa. Nas extremidades, apresentavam tampões bem evidentes. A coloração variou de transparente a amarelada (Figura 2.1). As características de espessura e deformidades na casca e o fato de não estarem embrionados e serem obtidos em amostras de urina de cães, foram os critérios usados para classificar como ovos de *D. renale* (Dioctophymatidae). WOODHEAD (1950) os descreveu como ovais e com coloração marrom-clara a amarela, quando removidos do rim.

A casca espessa e com depressões (rugosidades) pode ser importante característica morfológica para o ciclo de vida do parasito. Uma vez que esses ovos se desenvolvem em meio líquido, as depressões na parede podem ser uma adaptação para permitir um aumento de superfície, o que facilitaria a troca de oxigênio em áreas que possuem baixa quantidade de oxigênio dissolvido. As irregularidades podem fornecer pontos para a adesão de vegetação e biofilme, fazendo com que esses ovos sejam mais atrativos para os hospedeiros intermediários. Sob circunstâncias naturais, aos ovos de *Eustrongylides ignotus* (Enoplida: Dioctophymatoidea) aderem-se partículas, vegetação e bactérias nas irregularidades. Muitos oligochaetas de água doce alimentam-se de bactérias associadas aos detritos, e a presença das bactérias na

casca do ovo pode aumentar a probabilidade de que seja consumido por esses organismos (COYNER et al., 2003).




**Legenda:** A) Ovo fértil. Aumento de 640x. B) Ovo infértil. Aumento de 160x.

**Figura 2.1.** Ovos de *Dioctophyme renale* em urinas de cães naturalmente parasitados.

O tamanho desses ovos pode variar de 60-80 X 39-46 μm (FREITAS, 1980; COSTA et al., 2004). Os 102 ovos analisados apresentaram comprimentos entre 62,01 e 75,15 μm (67,23 ± 2,77) e largura entre 36,36 e 53,03 μm (42,78 ± 2,85), concordando com as dimensões já descritas na literatura por ANDERSON (2000), COSTA et al. (2004) e FREITAS (1980).

Tanto ovos férteis quanto inférteis foram detectados na urina dos cães analisados. Ovos que desenvolveram larva no seu interior, após incubação em BOD, em meio líquido, foram classificados como férteis. Aqueles que, nas mesmas condições, não desenvolveram larva foram classificados como inférteis. Os ovos inférteis apresentaram um comprimento que variou de 62,59 a 75,15 μm (67,62 ± 2,98) e a largura variou de 36,36 a 51,53 μm (42,73 ± 3,43). As dimensões dos ovos que embrionaram foram: comprimento de 64,12 a 70,23 μm (67,64 ± 2,19) e largura variando de 41,28 a 44,49 μm (42,93 ± 1,17). Embora uma relativa variação nas dimensões dos ovos tenha sido verificada no presente trabalho, nenhuma diferença

estatística significativa, foi encontrada, em comprimento (p= 0,9882, t= 0,0149, GL= 41) e largura (p= 0,7742, t= 0,2888, GL= 40) entre ovos férteis e inférteis incubados a 26 $^{o}$C em BOD, quando comparados ovos de *D. renale* oriundos de cistos renais de cães parasitados (Tabela 2.1). A diferença no tamanho dos ovos pode ser resultado tanto da maturidade sexual da fêmea ou, ainda, do fato de elas realizarem postura de ovos não fertilizados.

Quando comparados os valores absolutos de comprimento e largura dos ovos analisados, essas medidas parecem similares às de ovos deste nematódeo, obtidos de *M. vison* parasitados (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1.** Comparativo das dimensões de ovos de *Dioctophyme renale* de diferentes trabalhos publicados.

| Status dos ovos | Comprimento (µm) | Largura (µm) | Hospedeiro | Fonte |
|---|---|---|---|---|
| não citado | 74,3 | 46,7 | *M. vison* | Woodhead (1950) |
| inférteis | 68,7 | 42,4 | *M. vison* | Schacher e Faust (1956) |
| inférteis | 67,2 | 41,3 | *C. familiaris* | Schacher e Faust (1956) |
| Inférteis | 73 | 42 | *M. vison* | Mace e Anderson (1975) |
| Férteis | 73 | 52 | *M. vison* | Mace e Anderson (1975) |
| Inférteis | 67,62 | 42,73 | *C. familiaris* | *Presente trabalho* |
| Férteis | 67,64 | 42,93 | *C. familiaris* | *Presente trabalho* |

Na literatura disponível, em razão da ausência de nematódeos machos nos hospedeiros definitivos em que os parasitos fêmeas foram obtidos, os autores (SCHACHER e FAUST, 1956; MACE e ANDERSON, 1975) consideraram os ovos recuperados do útero das fêmeas como inférteis.

De *M. vison* abatidos no Canadá e que estavam com o rim parasitado, foram obtidos cistos renais só com parasitos fêmeas e outros com parasitos de ambos os sexos. Do útero de fêmeas oriundas de cistos sem machos foram removidos ovos não fertilizados, que apresentaram medidas de 73 x 42 µm, enquanto os oriundos de

fêmeas que estavam em cistos com machos mediram 73 x 52 μm, sendo a diferença na largura desses ovos estatisticamente significativa (MACE e ANDERSON; 1975). WOODHEAD (1950) descreveu os ovos obtidos em *M. vison* parasitados, com dimensões de 74,3 x 46,7 μm, entretanto não especificou se estavam ou não fertilizados.

SCHACHER e FAUST (1956) mediram 35 ovos obtidos de *M. vison* parasitado e o mesmo número de ovos de um material preservado proveniente de um cão parasitado. Esses autores descreveram as dimensões de ovos inférteis como sendo 68,7 x 42,4 μm e 67,2 x 41,3 μm, respectivamente, e consideraram as dimensões dos ovos obtidos nessas duas espécies como similares.

A maioria dos ovos obtidos continha apenas uma célula no interior, e alguns ovos, duas células. Dos nove cães analisados, oito apresentaram ovos contendo somente uma célula no momento que foram coletados da urina; e, em um dos cães, já na coleta dos ovos na urina apresentavam duas células. Os dois tipos de ovos tornaram-se larvados após cultivo. Aos oito dias de incubação, em temperatura de 26$^{o}$C, de quatro a oito células eram visíveis nos ovos de *D. renale* (Figura 2.2).

No experimento de MACE e ANDERSON (1975), foi observado que ovos removidos do útero de fêmeas do parasito não estavam embrionados e apresentavam duas células no interior, enquanto poucos ovos apresentavam somente uma célula no interior; porém somente os ovos que continham duas células embrionaram. WOODHEAD (1950) observou que os ovos removidos do útero de fêmeas do parasito que estavam no rim de *M. vison* apresentavam, usualmente, duas células e que permaneciam nesse estado até serem expostos ao oxigênio.

**Figura 2.2.** Ovo de *Dioctophyme renale* aos oito dias de incubação com oito células (aumento de 200x).

Nas três temperaturas avaliadas, houve embrionamento, porém a temperatura de incubação interferiu no tempo em que os ovos de *D. renale* levaram para que 50% deles estivessem com larva de primeiro estádio no interior.

Nas temperaturas de 15$^{o}$C, 20$^{o}$C e 26$^{o}$C, o tempo médio de incubação foi de 78, 48 e 18 dias, respectivamente. Estatisticamente, esses tempos foram significativamente diferentes para as três temperaturas avaliadas (**15x20** t= 3,3208, p = 0,016, GL= 6; **15x26** t= 13,7302, p = 0,00, GL= 5; **20x26** t= 3,8654, p = 0,0062, GL= 7). Uma repetição do GI e duas do GIII apresentaram contaminação fúngica e foram desprezadas. O desenvolvimento dos ovos foi dependente da temperatura, com o desenvolvimento mais rápido associado com a maior temperatura de incubação (Figura 2.3). Esse mesmo comportamento evolutivo foi observado para o *E. ignotus,* com formação de larvas de primeiro estádio, após 17 e 28 dias de incubação, em temperaturas de 28$^{o}$C e 19,5$^{o}$C, respectivamente (COYNER et al., 2004).

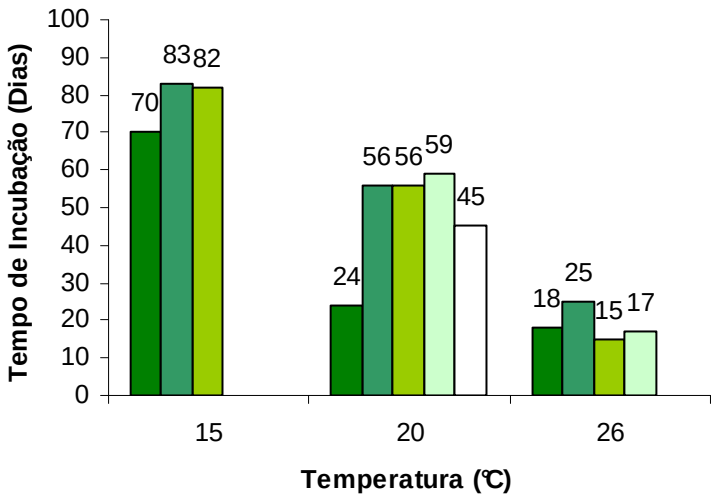



**Figura 2.3.** Tempo *versus* temperatura de incubação para embrionamento de 50% dos ovos de *Dioctophyme renale*. Legenda: Barras correspondem às repetições.

O desenvolvimento dos ovos é fundamental para a continuidade do ciclo biológico de *D. renale* e é dependente da temperatura (FREITAS, 1980). A temperatura ótima requerida para o embrionamento dos ovos está entre 25°C e 30°C. Em 30 dias, nessa temperatura, são observadas as larvas de primeiro estádio. Em baixas temperaturas, esse tempo de embrionamento pode ser de até sete meses (FREITAS, 1980).

As larvas de primeiro estádio de *D. renale* desenvolvem-se em água quando incubadas em temperatura de 14°C a 30°C, com variação da taxa de desenvolvimento conforme a temperatura (MACE e ANDERSON, 1975). Na temperatura de 20°C, as larvas estavam completamente desenvolvidas em aproximadamente 35 dias (MACE e ANDERSON, 1975). Neste trabalho, na mesma temperatura, desenvolveram-se em 48 dias. WOODHEAD (1950) observou formação de larvas após 21 dias de incubação em temperatura ambiente.

As larvas de primeiro estádio formadas no interior dos ovos apresentaram motilidade evidente por aproximadamente uma semana após sua formação (Figura 2.4). Essa observação foi similar à de WOODHEAD (1950) e MACE e ANDERSON (1975).

O desenvolvimento na dependência da temperatura pode indicar uma adaptação ao fluxo populacional de hospedeiros intermediários (MEASURES, 1988) e paratênicos. Porém o fato de os ovos se desenvolverem mais rapidamente em temperaturas elevadas difere do fato de esse parasitismo ser mais frequente em locais de clima frio, onde a temperatura ambiente, em determinadas épocas do ano, prolongaria o desenvolvimento do helminto. Outros fatores, como o pH, a salinidade da água ou a disponibilidade de hospedeiros, podem ser os responsáveis pelas maiores frequências nas regiões de clima mais frio.

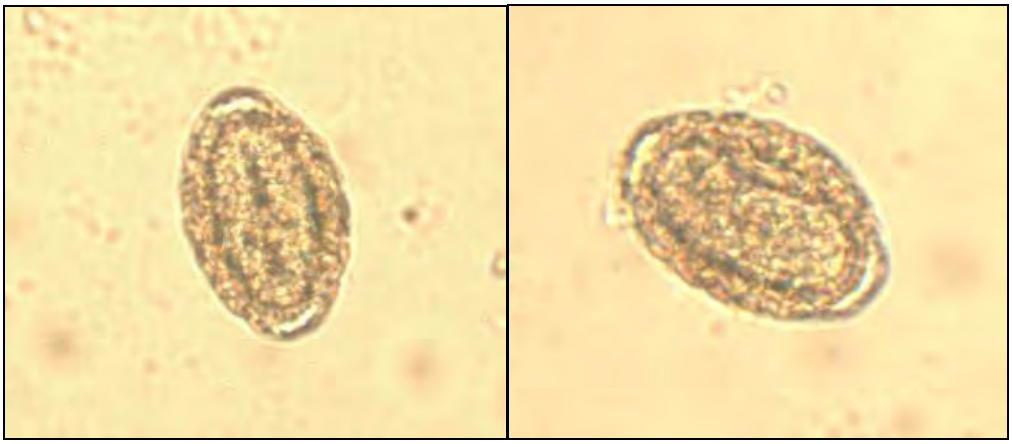


**Figura 2.4.** Ovos larvados de *Dioctophyme renale* aos 18 dias de incubação (aumento de 200x).

Os ovos incubados em água mineral alcalino-terrosa/ fluoretada e em solução de água ultra-purificada milliQ® com 0,1% de formalina desenvolveram-se normalmente, sem demonstrar diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p= 0,5529, t= -0,5959, GL= 82), podendo o seu cultivo ser realizado com qualquer dos meios testados (Figura 2.5). Entretanto, foi verificado que o uso da solução de formalina foi importante para reduzir e/ou impedir a multiplicação bacteriana e fúngica, principalmente naqueles casos em que o cão parasitado já apresentava infecção bacteriana do trato urinário.

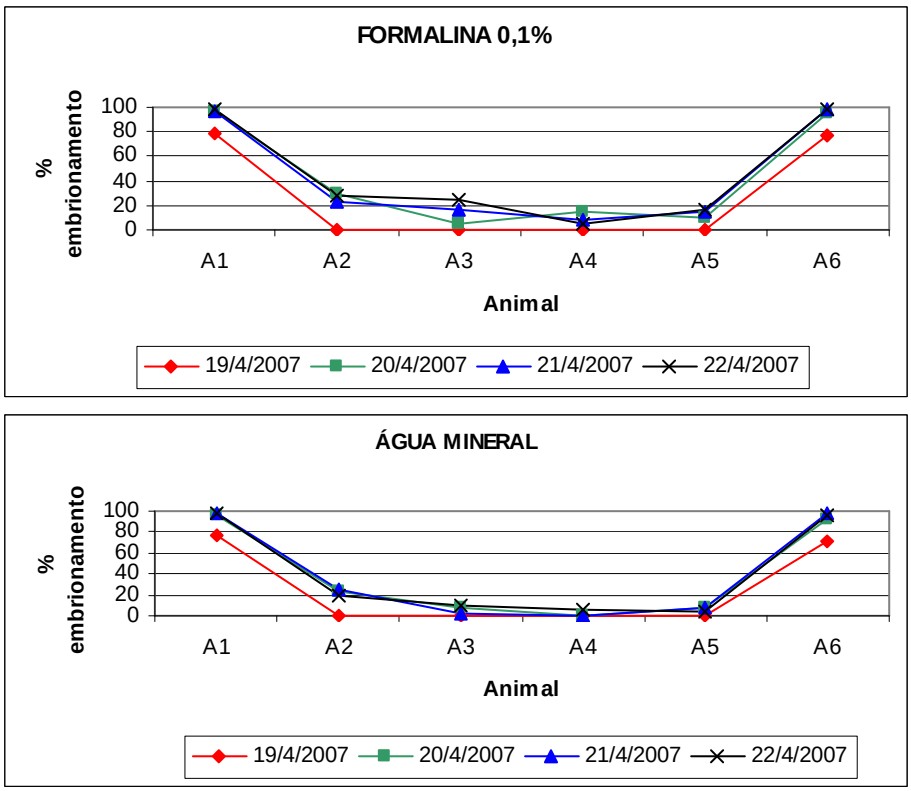



**Figura 2.5.** Percentual de embrionamento de ovos de *Dioctophyme renale* incubados em temperatura de 26ºC, de acordo com o meio utilizado.

## 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ovos de *D. renale,* provenientes de cães parasitados, apresentaram comprimento médio de 67,23 µm e largura média de 42,78 µm. Estatisticamente, o comprimento e a largura de ovos férteis comparados aos inférteis não apresentaram variação significativa.

Os ovos do parasito podem ser incubados para embrionamento tanto em água mineral quanto em solução de água milliQ® com 0,1% de formalina. Entretanto, a temperatura de incubação interfere no tempo de desenvolvimento. O tempo médio de incubação dos ovos foi inversamente proporcional à temperatura.

Outros fatores, como o pH e a salinidade da água, devem também ser avaliados para verificar o seu efeito no embrionamento dos ovos.

## CAPÍTULO III

# *Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782) (NEMATODA: ENOPLIDA) NO DISTRITO DE SÃO CRISTÓVÃO, TRÊS BARRAS, SANTA CATARINA, BRASIL: hospedeiros paratênicos e infecção experimental em um cão.[3]

# *Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782) (NEMATODA: ENOPLIDA) IN SÃO CRISTÓVÃO DISTRICT, TRÊS BARRAS COUNTY, SANTA CATARINA STATE, BRAZIL: paratenic hosts and experimental infection in a dog.

**RESUMO** - Larvas de *Dioctophyme renale* foram encontradas em cistos envolvidos por reação granulomatosa leve, na parede gástrica de 5,17% (3/58) dos *Chaunus ictericus*, provenientes do Distrito de São Cristóvão, Município de Três Barras, Santa Catarina, Brasil. No entanto larvas deste nematódeo não foram encontradas em *Chaunus schneideri* da mesma região, nem nos peixes das ordens Siluriformes, Characiformes e Perciformes estudados. Larvas do nematódeo foram imunomarcadas em tecidos de hospedeiro paratênico, pelos métodos de imuno-histoquímica e imunofluorescência indireta em tecidos, utilizando-se soros de camundongos imunizados com antígeno produzido a partir de esôfago de formas adultas de *D. renale.* A larva do parasito obtida de *C. ictericus* foi capaz de chegar à fase adulta em um cão experimentalmente

[3] Parte deste capítulo está publicada como PEDRASSANI, D. et al., *Chaunus ictericus* (Spix, 1824) as paratenic host of the giant kidney worm *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Enoplida) in São Cristóvão district, Três Barras county, Santa Catarina state, Brazil. **Veterinary Parasitology,** v.165, p.74-77, 2009.

infectado. Este é o primeiro relato de hospedeiros paratênicos de *D. renale* no Brasil e, provavelmente, também é o primeiro na região Neotropical.

**Palavras-chave:** *Dioctophyme renale*, larva, morfologia, *Chaunus ictericus*, hospedeiros paratênicos, peixes.

**ABSTRACT** - *Dioctophyme renale* larvae have been found in cysts surrounded by mild granulomatous reaction in the gastric wall of 5.17% (3/58) *Chaunus ictericus* specimens from São Cristóvão district, Três Barras municipality, Santa Catarina State, Brazil. However, larvae of this nematode were not found neither in *Chaunus schneideri* from the same region nor in analyzed fish of the orders Siluriformes, Characiformes and Perciformes. The nematode larvae were immunostained in tissue of paratenic host by methods of immunohistochemistry and indirect immunofluorescence in tissues, using sera from mice immunized with antigen produced from the esophagus of adults of *D. renale*. The larvae of this parasite obtained from *C. ictericus* was able to reach adulthood in a dog experimentally infected. This is the first report of paratenic hosts for *D. renale* in Brazil, and probably is also the first in the Neotropical region.

**Key words:** *Dioctophyme renale*, larvae, morphology, *Chaunus ictericus*, paratenic hosts, fishes.

## 1. INTRODUÇÃO

*Dioctophyme renale* é um nematódeo parasito do rim de carnívoros domésticos e silvestres no Brasil. Pode ser observado erraticamente na cavidade peritoneal, especialmente em canídeos, e, raramente, ocorre em outros órgãos e tecidos (MEASURES, 2001). Sua epidemiologia envolve um ciclo evolutivo complexo, em que

os ovos contendo larvas de primeiro estádio são ingeridos por um oligochaeta aquático (*Lumbriculus variegatus),* e o hospedeiro definitivo é infectado a partir da ingestão desses anelídeos ou de hospedeiros paratênicos infectados (ANDERSON, 2000).

As larvas do parasito foram observadas encapsuladas na parede do estômago, na musculatura abdominal e no mesentério de *Rana catesbeiana, R. clamitans melanota* e *R. septentrionalis* do Canadá (MACE e ANDERSON, 1975). Ainda foram relatadas em algumas espécies de peixes de água doce, nesse mesmo país, como: *Pseudoscaphirynchus kaufmanni*, *Ictalurus nebulosus, I. melas, Esox lucius*, *Leuciscus idus, Aspius aspius, Rutilus rutilus, Chalcalburnus chalcoides, Pelecus cultratus, Barbus branchicephalus, Gobio gobio, Alburnoides taeniatus*, *Perca fluviatilis, Silurus glanis, Gambusia affinis, Lepomis gibbosus, L. cyanellus, Micropterus salmoides* (MEASURES e ANDERSON; 1985; MEASURES, 2001).

No Brasil, *Chaunus schneideri* apresenta ampla distribuição geográfica, sendo registrado nos biomas Caatinga e Cerrado, extrapolando ainda para as regiões de Mata Atlântica e Campos Sulinos, enquanto C. *ictericus* tem uma distribuição mais concentrada na Mata Atlântica (PINHÃO, 2005).

No Distrito de São Cristóvão, Município de Três Barras – SC, o parasitismo por *D. renale* é frequentemente observado na população canina (PEDRASSANI e CAMARGO, 2004). Apesar disso, pouco se conhece acerca da biologia das formas larvais desse nematódeo, na região Neotropical, e o conhecimento de hospedeiros paratênicos auxilia na compreensão de como os hospedeiros definitivos são infectados.

Com base nessa observação, este estudo teve o objetivo de pesquisar a ocorrência de larvas de terceiro estádio (L3) de *D. renale,* em hospedeiros paratênicos no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina, Brasil, por meio de técnicas clássicas de helmintologia, além de reações de imuno-histoquímica e imunofluorescência indireta em tecido na caracterização da larva.

# 2. MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1. ÁREA DE ESTUDO

O Distrito de São Cristóvão pertence ao Município de Três Barras, Santa Catarina, Brasil. Esta região possui condições socioeconômicas desfavoráveis, com IDH de renda municipal de 0,662 em 2000 (PNUD-BR, 2009), sem coleta de esgoto e com a maioria das ruas sem pavimentação asfáltica. Grande parte do Distrito é delimitada pelo curso do rio Canoinhas e, ainda, existe um grande canal de vazão do rio, além de canais acessórios. Apesar disso, é uma região bastante propensa a alagamentos nas épocas de chuva. Esse rio é importante para o Planalto Norte do Estado de Santa Catarina, servindo como fonte de captação de águas para o abastecimento de muitos municípios, inclusive do Município de Três Barras. Atravessa uma área de intensa atividade agrícola, estando sujeito à contaminação por resíduos de agrotóxicos, adubos químicos, resíduos de indústrias do setor papeleiro e de uma grande empresa de produção de suínos (MARQUES, 2007). A vegetação original da região é classificada como Floresta Ombrófila Mista Montana e, ao longo dos cursos d'água, como Floresta Ombrófila Mista Aluvial (IBGE, 1992). O clima regional, de acordo com a classificação de Köeppen, é do tipo Cfb, mesotérmico úmido, cujos verões são frescos, com média de temperatura inferior a 22ºC, e os invernos, severos. Apresenta, no mês mais frio, temperatura média inferior a 18ºC, com ocorrência de geadas frequentes (FUNPAR, 2002). Atualmente, a situação ambiental é precária, tanto em relação às águas quanto à vegetação das margens, recobertas por culturas agrícolas, silvicultura, pastagens ou capoeiras baixas. A estrutura e a fisionomia aparente da vegetação apontam interferências antrópicas na área, mas ainda restam características da composição florística original (FOSSATI et al*.,* 2006).

## 2.2. HOSPEDEIROS PARATÊNICOS DE *Dioctophyme renale*

Anuros: o estudo foi realizado com 100 exemplares de bufonidae, 58 *Chaunus ictericus* (Spix, 1824) e 42 *C. schneideri* (Werner, 1894), capturados, manualmente, entre março de 2007 e fevereiro de 2008, no Distrito de São Cristóvão, conforme autorização do IBAMA 060/2007/CGFAU. A classificação taxonômica dos anuros foi realizada de acordo com FROST et al. (2006). Os sapos foram coletados de seis locais do Distrito – 1) Lat.: 26$^{o}$08'58,52220''S, Long.: 50$^{o}$22'40,37731''W; 2) Lat.: 26$^{o}$08'40,13742''S, Long.: 50$^{o}$22'47,21918''W; 3) Lat.: 26$^{o}$08'33,25897"S, Long.: 50$^{o}$22'47,88671''W; 4) Lat.: 26$^{o}$09'47,13746''S, Long.: 50$^{o}$22'50,27050''W; 5) Lat.: 26$^{o}$10'05,92012''S, Long.: 50$^{o}$23'12,81108''W; 6) Lat.: 26$^{o}$08'54,41052''S, Long.: 50$^{o}$22'46,06804''W (Figura 3.1), onde foi detectada a presença de cães com diagnóstico positivo de *D. renale,* por exame de urina, em região de peridomicílio e sempre próximos a coleções hídricas, como o rio Canoinhas e seus canais de vazão.

Peixes: o estudo foi realizado com 100 exemplares, capturados com redes de pesca, entre setembro de 2007 e outubro de 2008, no rio Canoinhas, na porção que banha o Distrito de São Cristóvão, conforme autorização do IBAMA 032/2007/CGREP. A classificação taxonômica foi realizada de acordo com BRITSKI et al. (1984), FERREIRA et al. (1998) e SANTOS et al. (2006), tendo sido capturados os seguintes espécimes:

- Ordem Siluriformes: Família Loricariidae (*Hypostomus punctatus,* cascudo, n=42), Família Pimelodidae (*Pimelodus maculatus*, mandi, n=06, *Rhamdia* spp., bagre, n=02); ´

- Ordem Characiformes: Família Prochilodontidae (*Prochilodus lineatus*, curimba, n=30); Família Characidae (*Astyanax* spp., lambari, n=01), Família Erythrinidae (*Hoplias malabaricus,* traíra, n=18);

- Ordem Perciformes: Família Cichlidae (*Chaetobranchus flavescens*, acará-branco, n=01).

## 2.3. NECROPSIAS

Após serem medidos, a eutanásia dos sapos e peixes foi procedida com aplicação intraperitoneal de 100mg/kg de tiopental sódico, seguida de decapitação ou secção da medula espinhal, segundo recomendações da AVMA (2007). Em seguida, foram necropsiados e examinados sob estereomicroscópio Coleman. Todas as vísceras, cavidades e a musculatura foram examinadas para pesquisa das larvas de *D. renale*.

Fragmentos do tecido com as vesículas com larva foram removidos. Parte das larvas foi removida com o auxílio de pinças e fixada em solução de Railliet e Henry para morfometria. A outra parte foi fixada em formol tamponado a 10% para a análise histopatológica, imuno-histoquímica e de imunofluorescência indireta em tecidos. Uma vesícula foi administrada a uma cadela de três meses de idade, do canil do Hospital Veterinário da Universidade do Contestado, para testar a infectividade larval, conforme detalhado adiante.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa, sendo o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Contestado (Parecer n$^{o}$ 67/2006).

## 2.4. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Os estudos morfológicos foram desenvolvidos no laboratório de Enfermidades Parasitárias da FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP. Os espécimes foram clarificados com ácido acético 80% entre lâmina e lamínula e analisados em sistema computadorizado de análise de imagens (programa ImagePro Plus v.4.1). Das amostras foram obtidas imagens das larvas por meio do microscópio óptico trinocular (Olympus BX-51, equipado com câmera digital QColor 3, com 3.1 MP de resolução) e então foi realizada a análise morfométrica. A identificação das larvas de *Dioctophyme* foi realizada, tendo-

se como referências básicas os trabalhos de MACE e ANDERSON (1975) e MEASURES e ANDERSON (1985).

Os indicadores de prevalência e de intensidade parasitária foram calculados de acordo com BUSH et al. (1997). As medidas das larvas, com primórdios genitais de machos e fêmeas foram comparadas estatisticamente pelo teste t de Student, significativo se $p \leq 0,05$.

## 2.5. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE HOSPEDEIRO DEFINITIVO

Para verificar a infectividade para hospedeiros definitivos (cão) e confirmar a identificação específica das larvas, um animal jovem foi alimentado com um fragmento de estômago de *C. ictericus,* contendo uma vesícula com L3, administrada diretamente por via oral. O cão foi acompanhado mensalmente por ultrassom (Pie Medical modelo 100), urinálise, hemograma e bioquímica renal até completar o período pré-patente mínimo, de 135 dias, citado na literatura (ANDERSON, 2000) para essa espécie de nematódeo.

**Figura 3.1.** Locais de coleta dos Anuros no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina, Brasil.

## 2.6. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS, CONTRA ANTÍGENO DE FORMAS ADULTAS DE *Dioctophyme renale,* EM CAMUNDONGOS

Para verificar a identidade das larvas, pelas técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência indireta em tecido, foi necessária a produção de anticorpos policlonais contra antígenos do *D. renale*. Para a produção dos anticorpos policlonais, foram utilizados seis camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Balb-c, todos fêmeas, com aproximadamente oito semanas de idade. Antes da imunização, os animais passaram por um período de adaptação no Biotério do Departamento de Patologia Veterinária, da FCAV/Unesp, Jaboticabal–SP. Posteriormente, os animais foram divididos em dois grupos com três animais em cada. Os animais imunizados receberam 10 μg de proteína do antígeno de extrato solúvel de esôfago de formas adultas de *D. renale* (Capítulo IV), emulsificado em adjuvante completo de Freud, por via intramuscular, no quadríceps. Duas outras imunizações foram realizadas, no 14$^{o}$ e 28$^{o}$ dia após a primeira, com a mesma dose e via, utilizando-se o adjuvante incompleto de Freud. Para a aplicação nos animais do grupo-controle, o antígeno foi substituído por solução salina (0,9%). Dez dias após a aplicação da última dose, os animais foram mortos em cuba com éter, sendo o sangue coletado por punção intracardíaca, centrifugado, e o soro obtido, congelado a -20$^{o}$C até o uso. Depois de verificada a produção de anticorpos anti-*D. renale* pela reatividade dos soros dos camundongos pelo "*Western blotting*" (Capítulo IV), esses soros foram utilizados nas reações de imuno-histoquímica e imunofluorescência indireta em tecido, como anticorpo primário.

## 2.7. EXAME HISTOPATOLÓGICO

Após a fixação do fragmento tecidual com a larva em formol, este foi processado, conforme rotina convencional de processamento histológico, com desidratação em diluições crescentes de álcoois e diafanização em xilol, para inclusão em blocos de parafina histológica. Os cortes foram feitos em micrótomo com 4 μm de espessura e

colocados em lâmina de microscopia. As lâminas com os cortes foram mantidas em estufa a 60$^{o}$C, por uma hora, e submetidas à desparafinização em xilol e reidratação em diluições decrescentes de álcoois. Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina e avaliados em microscópio óptico.

## 2.8. TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

O método de IHQ usado foi essencialmente o descrito por HSU et al. (1997), com pequenas modificações. Cortes de 4 μm de espessura foram montados em lâminas pré-tratadas com Poly-L-Lisina (SIGMA, cat. n$^{o}$ 1399), para promover melhor aderência dos cortes às lâminas. No momento da reação, as lâminas foram deixadas em estufa por 1 hora. A desparafinização e a reidratação foram feitas em baterias de xilóis e álcoois em concentrações decrescentes. A seguir, as lâminas foram lavadas por 10 vezes em água destilada. Para a recuperação antigênica, receberam tratamento em banho-maria, por 40 minutos, em solução-tampão TRIS EDTA (pH 9,0) pré-aquecida a 92$^{o}$C. Depois de resfriadas por 20 minutos, as lâminas foram lavadas por 10 vezes em água destilada. Prosseguindo, receberam tratamento com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (3%) para bloqueio da peroxidase endógena, por uma vez, durante 10 minutos, ao abrigo da luz. Depois foram incubados, por 20 minutos, com *Protein Block* (Dako Cytomation, ref. X0909), para bloqueio das reações inespecíficas. Em seguida, foram incubados durante 12 horas, a 4$^{o}$C, com o anticorpo primário em câmara úmida. O anticorpo primário, utilizado como controle positivo, foi soro imune de camundongos Balb-c (imunizados com extrato solúvel de esôfago de formas adultas de *D. renale*), e como controle negativo, soro de camundongos Balb-c (que receberam apenas solução salina) diluídos a 1:100, 1:300, 1:500 e 1:800 em PBS (pH 7,2). As lâminas foram lavadas duas vezes, por cinco minutos cada, em PBS (pH 7,2). Para detecção do anticorpo primário, foi utilizado como anticorpo secundário o Kit EnVision sistema polímero-peroxidase (Dual Link System – HRP, Dako Cytomation, ref. K4061 e K4063) por 1 hora. As lâminas foram lavadas três vezes, por cinco minutos cada, em PBS (pH

7,2). As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (Dako Cytomation Liquid DAB+Substrate Chromogen System, Dako Cytomation, ref. K3468) e contracorados pela hematoxilina de Harris, por um minuto, e então lavados em água corrente. A desidratação dos cortes foi feita em gradiente crescente de álcoois e xilóis, seguida pela montagem com lamínula em meio permanente de bálsamo-do-Canadá. Para a avaliação dos resultados, foram consideradas positivas as larvas que apresentaram marcações marrons nos seus tecidos.

## 2.9. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM TECIDOS (RIFIT)

A técnica utilizada foi preconizada por MACHADO (2006, não publicado) e já utilizada por FURUTA (2008) com pequenas modificações. Os cortes de estômago de *Chaunus ictericus*, parafinados e tratados com Poly-L-Lisina, foram mantidos em estufa, a 60$^{o}$C, durante 30 minutos. Após essa etapa, foram realizados os procedimentos de desparafinização e reidratação, conforme descrito para a imuno-histoquímica. As lâminas, em seguida, foram lavadas por três vezes, por cinco minutos cada em PBS (pH 7,2) e submetidas à recuperação antigênica em banho-maria, por 40 minutos, em solução-tampão TRIS EDTA (pH 9,0), pré-aquecida a 92℃. Após estabilização da temperatura, fez-se uma lavagem por 10 vezes em água destilada. Após as lavagens, receberam tratamento com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (3%) para bloqueio da peroxidase endógena, por uma vez, durante 10 minutos, ao abrigo da luz. Depois foram incubados, por 20 minutos, com *Protein Block* (Dako Cytomation, ref. X0909), para bloqueio das reações inespecíficas. Em seguida, foram incubados com o anticorpo primário em câmara úmida. O anticorpo primário, utilizado como controle positivo, foi soro imune de camundongos Balb-c (imunizados com extrato solúvel de esôfago de formas adultas de *D. renale*), e como controle negativo, soro de camundongos Balb-c (que receberam apenas solução salina) diluídos a 1:70 e 1:100 em PBS (pH 7,2). Após um período de incubação de duas horas a 37$^{o}$C, em câmara úmida, as lâminas foram lavadas por três vezes em PBS. Em seguida, adicionou-se

conjugado de coelho anti-IgG de camundongo (Sigma cat n$^{o}$ F9137), acoplado ao isotiocianato de fluoresceína, na diluição de 1:200 em PBS (pH 7,2) com 10% de azul-de-Evans, e as lâminas novamente foram incubadas, por duas horas, em câmara úmida, a 37$^{o}$C. Procedeu-se a nova série de lavagens em PBS. As lâminas foram montadas com lamínulas e glicerina tamponada (pH 9,0), e imagens foram obtidas em microscópio óptico trinocular (Olympus BX-51) equipado com luz ultravioleta e câmera digital QColor 3, com 3.1 MP de resolução.

Foram considerados resultados positivos aqueles em que a larva apresentou fluorescência em seus tecidos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As medidas das espécies de sapos coletados são apresentadas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Biometria e número de espécimes de cada sexo dos sapos capturados no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, SC, Brasil.

| | ***C.ictericus*** **(n=58)** | ***C. schneideri*** **(n=42)** |
|---|---|---|
| Comprimento médio dos espécimes | 20,015 cm | 16,071 cm |
| Número de fêmeas | 36 | 28 |
| Comprimento médio de fêmeas | 20,05 cm | 15,875 cm |
| Número de machos | 22 | 14 |
| Comprimento médio de machos | 19,959 cm | 16,464 cm |

A prevalência de larvas de *D. renale* nos 100 sapos coletados foi de 3%. Destes, em *C. ictericus,* foi de 5,17% (3/58), e em *C. schneideri,* nenhuma larva foi observada. A intensidade média de parasitismo foi de 5,33 (mínima: 1; máxima: 10) larvas por hospedeiro infectado. Dos locais pesquisados, em dois foram capturados sapos parasitados: um animal no local 6 e dois animais parasitados no local 1 (Figura 3.1). Nessa região, de 40 cães que foram necropsiados, no período de 2000 a 2003, 30% estavam parasitados por *D. renale* (PEDRASSANI e CAMARGO, 2004), demonstrando ser a área favorável para o desenvolvimento desse helminto. *C. ictericus* é um anfíbio que apresenta ampla distribuição geográfica, adapta-se com facilidade a ambientes

alterados e pode ser comumente encontrado próximo a habitações humanas (SABAGH e CARVALHO-E-SILVA, 2008), tendo sido capturado em peridomicílio no Distrito São Cristóvão.

O conhecimento dos hospedeiros paratênicos auxilia no entendimento da maneira como esses organismos se infectam com *D. renale*. SABAGH e CARVALHO-E-SILVA (2008), ao examinarem estômagos de *C. ictericus,* verificaram que os oligochaeta fazem parte da dieta alimentar desses anuros, embora os principais itens sejam formigas e coleópteros. Verificaram, ainda, a presença de presas aquáticas, sugerindo que essa espécie de sapo se alimenta em corpos d'água. Esses aspectos alimentares indicam a possibilidade de que anelídeos aquáticos, como o hospedeiro intermediário de *D. renale*, façam parte dos itens alimentares desses anuros.

Sapos normalmente não fazem parte da dieta de cães, porém, em razão das condições socioeconômicas da região estudada, os cães não recebem alimentação adequada e buscam fontes alternativas de proteína animal. Como a disponibilidade de anuros é grande, principalmente em determinadas épocas do ano, vários cães foram observados alimentando-se de sapos nas ruas do Distrito.

Larvas infectantes de *D. renale* foram encontradas em anuros do gênero *Rana* naturalmente infectados*,* sendo a prevalência observada de 5,6%, na região do Black River, e de 2,8%, na região do Lake Sasajewan, áreas enzoóticas para dioctofimatose em *Mustela vison,* com média de 1,6 larvas por sapo infectado. A prevalência variou de acordo com as espécies, sendo de: 6,2% para *Rana catesbeiana,* 0,7% para *R. clamitans melanota* e de 9,6% para *R. septentrionalis,* todos na primeira região; e de 2,8% para *Rana catesbeiana* na segunda região*.* Com esses achados, MACE e ANDERSON (1975) sugeriram que anuros são hospedeiros paratênicos naturais importantes nestas regiões estudadas do Canadá. A prevalência, descrita por estes autores, na região do Black River foi similar à deste trabalho para *C. ictericus*, enquanto na região do Lake Sasajewan foi inferior; e a média de larvas por anuro parasitado foi inferior à deste trabalho.

As larvas infectantes de *Dioctophyme,* que se tornam encapsuladas em *Rana* spp., permanecem viáveis por longos períodos e são infectantes para *M. vison* (MACE e

ANDERSON, 1975). A longevidade das L3, encapsuladas em vísceras e musculatura de sapos e peixes, ainda não foi estudada, mas, provavelmente, elas devem permanecer vivas e infectantes por vários anos (MEASURES, 2001).

Nos três exemplares de *C. ictericus,* as larvas foram encontradas sob a serosa gástrica, em vesículas semitransparentes, sem sinais aparentes de resposta inflamatória. Foi possível observar, por transparência, no interior de cada vesícula, uma larva fortemente espiralada, de coloração avermelhada *in vivo.* As vesículas eram ovaladas e apresentavam diâmetro médio de 1,5 mm, não sendo visíveis pela mucosa estomacal. Um espécime recuperado foi depositado na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC n$^{o}$ 35629). Assim, larvas foram observadas somente em parede do estômago; já MACE e ANDERSON (1975) observaram a maioria das larvas encapsuladas na parede estomacal e na musculatura abdominal.

Na avaliação histopatológica, as larvas estavam localizadas nas camadas serosa ou muscular gástrica, circundadas por tecido fibroso. Apresentavam uma cutícula fina e, abaixo dela, era visível a musculatura somática do tipo celomiária polimiária. Havia uma discreta reação inflamatória, com predomínio de mononucleares; raros eosinófilos e células gigantes foram observados ocasionalmente (Prancha I - Figura 1). As lesões são semelhantes às observadas por MEASURES e ANDERSON (1985) para L3 de *Dioctophyme* em musculatura de peixes.

Em razão de os helmintos estarem enrolados nos nódulos, na histopatologia foram visualizados de quatro a sete cortes da larva, sendo possível a observação de esôfago e intestino em alguns deles (Prancha I - Figura 1). Possuem oito cordões nervosos longitudinais (dorsal, ventral, dois laterais, dois subventrais e dois subdorsais). O cordão ventral é o mais evidente, apresentando forma de leque, sendo os outros cordões menores e, por vezes, pouco discerníveis (Prancha I - Figura 2).

O esôfago apresentou uma parede espessa, que corou fortemente pela hematoxilina, e o formato do lúmen era triangular, dado concordante com a descrição de URANO et al. (2001). O intestino era composto por uma única camada de células colunares e uninucleadas, com microvilosidades e com lúmen repleto de grânulos densos (Prancha I - Figura 3).

O comprimento médio das L3 foi de 10,0463 mm, e estas conservavam a cutícula da segunda muda (Prancha I - Figura 4). Duas fileiras concêntricas, de seis papilas cada, foram observadas ao redor da abertura oral (Prancha I – Figura 5). Na fileira interna, as papilas laterais eram duplas. Um par de anfídias estava situado lateralmente, entre as fileiras interna e externa de papilas. A distância da 1ª e 2ª fileiras de papilas até a extremidade anterior era de 13,6 e 30,2 µm, respectivamente. O esôfago, com 3,5047 mm de comprimento médio, apresentava aspecto homogêneo, era precedido por uma faringe com 0,0839 mm de comprimento e ocupava cerca de 35,5% do comprimento da larva (Tabela 3.2). Uma válvula esôfago-intestinal foi observada na região esofagiana, projetando-se no lúmem intestinal.

O anel nervoso, localizado a 112,3 µm da extremidade anterior, situava-se próximo à junção faringo-esofagiana, e dois pares de gânglios nervosos acessórios foram observados caudalmente a este (Tabela 3.2). O intestino estava rodeado por células fusiformes, que se conectavam com a hipoderme de um lado e com a parede do intestino de outro. O primórdio genital foi observado como um cordão longitudinal com numerosos núcleos pequenos, localizado ventralmente na membrana do pseudoceloma, estando os aspectos morfológicos de acordo com as descrições de MACE e ANDERSON (1975) e de URANO et al. (2001). O primórdio genital da larva fêmea estava localizado, em média, a 4,3468 mm da extremidade anterior, e a abertura vulvar estava localizada próxima a junção esôfago-intestinal (Prancha I - Figura 6), não sendo possível distinguir os órgãos sexuais.

O reto estava sustentado por células alongadas dispostas em dois grupos, dorsal e ventral, oblíquos à hipoderme e perpendiculares ao reto. O ânus era terminal e precedido por um grupo de papilas sésseis. Na extremidade posterior, apresentava um prolongamento cuticular subterminal (Prancha I - Figura 4). Quanto às medidas avaliadas, não houve diferença significativa entre as larvas machos e fêmeas ($p>0,05$) (Tabela 3.2), assemelhando-se aos resultados de MACE e ANDERSON (1975).

Parasitos do gênero *Eustrongylides,* da família Dioctophymatidae, também podem ser observados em sapos. A família possui duas subfamílias, Dioctophymatinae e Eustrongylinae, que são diferenciadas uma da outra pela posição da vulva, localizada

na região esofageana, na primeira, e na extremidade posterior do corpo, na última (ANDERSON e BAIN, 1982).

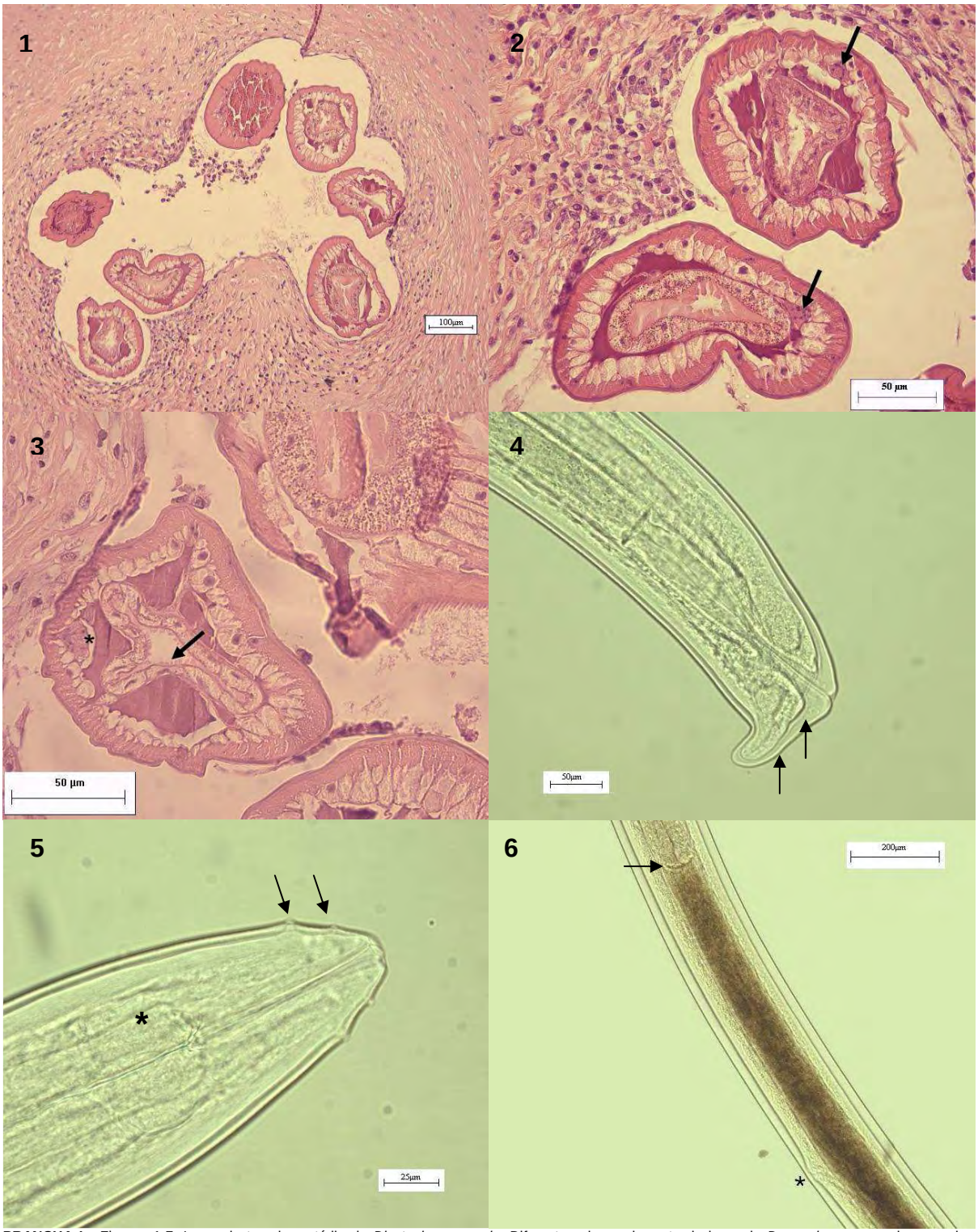
**Tabela 3.2.** Medidas em milímetros (média e desvio padrão) de larvas de terceiro estádio de *Dioctophyme renale,* obtidas de *Chaunus ictericus* naturalmente parasitados no período de março de 2007 a fevereiro de 2008, no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, SC, Brasil.

| **Número de larvas** | **Geral (n=8)** | **L3 Macho (n=4)** | **L3 Fêmea (n=4)** |
|---|---|---|---|
| | **Média (± DP)** | **Média (± DP)** | **Média (± DP)** |
| Comprimento total do corpo | 10,0463 (±1,9981) | 9,3507 (±1,4676) | 10,7420 (±2,4232) |
| Anel nervoso* | 0,1123 (±0,0090) | 0,1136 (±0,0073) | 0,1109 (±0,0114) |
| Largura** | 0,0636 (±0,0049) | 0,0645 (±0,0021) | 0,0627 (±0,0070) |
| Comprimento do esôfago | 3,5047 (±0,5105) | 3,5027 (±0,0966) | 3,5067 (±0,7738) |
| % total do comprimento do corpo | 35,49 (±5,59) | 38,28 (±7,17) | 32,70 (±0,81) |
| Largura na junção esôfago-intestino | 0,1688 (±0,0441) | 0,1842 (±0,0233) | 0,1533 (±0,0580) |
| Primórdio vulvar* | 4,3468 (±1,0233) | - | 4,3468 (±1,0233) |
| Comprimento do reto | 0,1665 (±0,0440) | 0,1720 (±0,0199) | 0,1609 (±0,0635) |
| Comprimento da faringe | 0,0839 (±0,0101) | 0,0814 (±0,0101) | 0,0863 (±0,0109) |
| Distância da 1$^{a}$ fileira de papilas da extremidade anterior | 0,0136 (±0,0019) | 0,0143 (±0,0022) | 0,0128 (±0,0013) |
| Distância da 2$^{a}$ fileira de papilas da extremidade anterior | 0,0302 (±0,0032) | 0,0306 (±0,0030) | 0,0297 (±0,0038) |

**na altura do anel nervoso; *distância da extremidade anterior; DP=desvio padrão.

Apesar da semelhança entre as larvas de *Dioctophyme* e *Eustrongylides*, elas podem ser diferenciadas pela localização do primórdio genital. MACE e ANDERSON (1975) descreveram que, nas L3 fêmeas de *D. renale* (Dioctophymatinae), o primórdio vulvar está localizado a aproximadamente 0,5 mm atrás da junção esôfago-intestinal, ou seja, em posição anterior. Como o gênero *Dioctophyme* possui apenas uma espécie descrita, a larva identificada trata-se de *D. renale*.

Neste trabalho, as larvas observadas, por características como: cordões nervosos longitudinais, principalmente o ventral, que é maior e com formato de leque (ORIHEL e ASH, 1995) e a posição da abertura do primórdio vulvar, pertencem à subfamília Dioctophymatinae. Ainda, medidas de morfometria similares, o primórdio vulvar em posição anterior, a imaturidade do sistema reprodutivo e o arranjo das papilas cefálicas das larvas encontradas em *C. ictericus* foram semelhantes às observações de MACE e ANDERSON (1975), em *Rana* spp. do Canadá, naturalmente infectadas por *D. renale*, o que comprova a identificação específica das larvas, descartando-se a hipótese de serem larvas de *Eustrongylides*.




**PRANCHA I -** Figuras 1-7. Larva de terceiro estádio de *Dioctophyme renale*: Diferentes planos de corte da larva de *D. renale* em camada muscular do estômago de *Chaunus ictericus* (100x, coloração H&E) **(1)**. Corte transversal da larva circundada por tecido fibroso, com discreta reação inflamatória, com predomínio de mononucleares e raros eosinófilos (400x, coloração H&E). Notam-se cordões nervosos (seta) **(2)**. Cortes da larva em região de intestino (400x, coloração HE). Notam-se células intestinais (setas) e cordão ventral com formato de leque (asterisco) **(3)**. Extremidade posterior de larva macho (200x, Creososto de Faya). Notam-se duas cutículas na região anal da larva (setas) **(4)**. Extremidade anterior com dois círculos de papilas (setas) e anel nervoso (asterisco)(400x, Creososto de Faya) **(5)**. Primórdio vulvar (asterisco) de larva fêmea próximo à junção esôfago-intestinal (seta) (100x, Creososto de Faya) **(6)**.

Os peixes examinados mediram de 18 a 47 cm (25±5,06) de comprimento, tanto machos quanto fêmeas, e eram de diferentes espécies, sendo mais frequentes os cascudos e os curimbas. Nos 100 espécimes necropsiados, não foram encontradas larvas de *D. renale*.

Quanto à reação de IHQ, os soros dos camundongos imunizados apresentaram marcações em todas as diluições testadas, com melhor discriminação com a diluição de 1:800 (Prancha II). A análise da presença de larvas de *D. renale* por IHQ nas amostras de tecido de *C. ictericus* naturalmente parasitados foi realizada para complementar a identificação das larvas nesse hospedeiro paratênico. Foram detectadas imunomarcações na larva em hipoderme, camada muscular, ligamentos no pseudoceloma, células intestinais e parede esofágica. A cutícula e o líquido do pseudoceloma não apresentaram marcação (Prancha II - Figura 9). Nos tecidos da parede estomacal do *C. ictericus*, houve uma discreta marcação das glândulas gástricas. Essa marcação deve ser resultante de reações inespecíficas do antígeno, uma vez que este foi elaborado do esôfago do nematódeo, onde existem células glandulares relacionadas ao processo de digestão que devem ser similares a esses organismos. Os soros de camundongos-controles negativos (não imunizados) não apresentaram marcações pela técnica de IHQ (Prancha II - Figura 8).

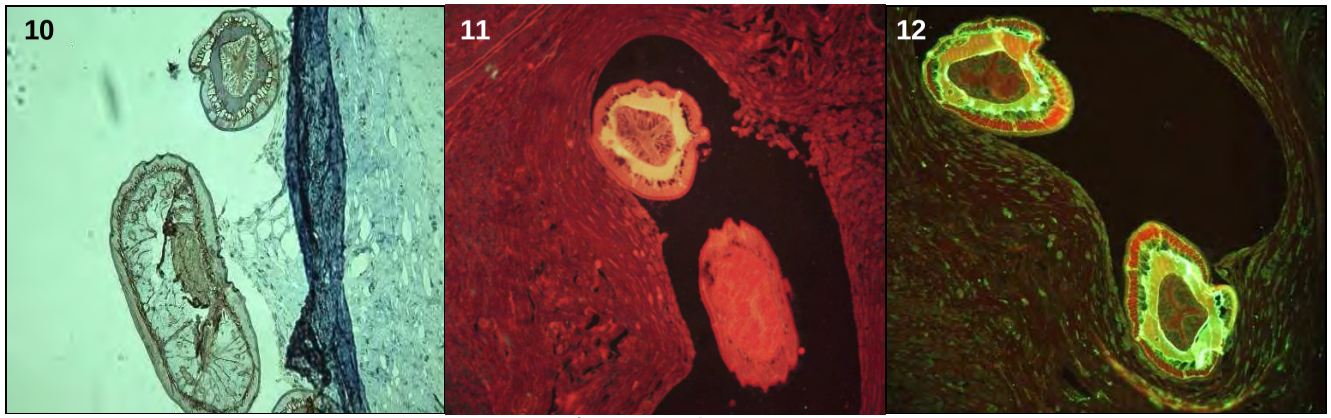
Na RIFIT, também houve reconhecimento dos tecidos da larva no corte histológico, quando este foi incubado com o soro do camundongo imunizado com o antígeno de *D. renale*, reafirmando a identificação da larva. O reconhecimento foi evidenciado pela presença de fluorescência na larva, principalmente na hipoderme e no líquido e ligamentos do pseudoceloma (Prancha III). Quando os cortes foram submetidos ao soro de camundongos-controles negativos, não foi verificada fluorescência no corte histológico da larva (Prancha III - Figura 11). Quanto à diluição dos soros, na diluição de 1:100, a fluorescência foi pouco evidente e tornou-se intensa com a diluição de 1:70, que foi a utilizada (Prancha III - Figura 12).

As marcações obtidas na IHQ e na RIFIT reforçam a identidade das larvas encontradas e são as primeiras avaliações dessa natureza realizadas com larvas de *D. renale*.

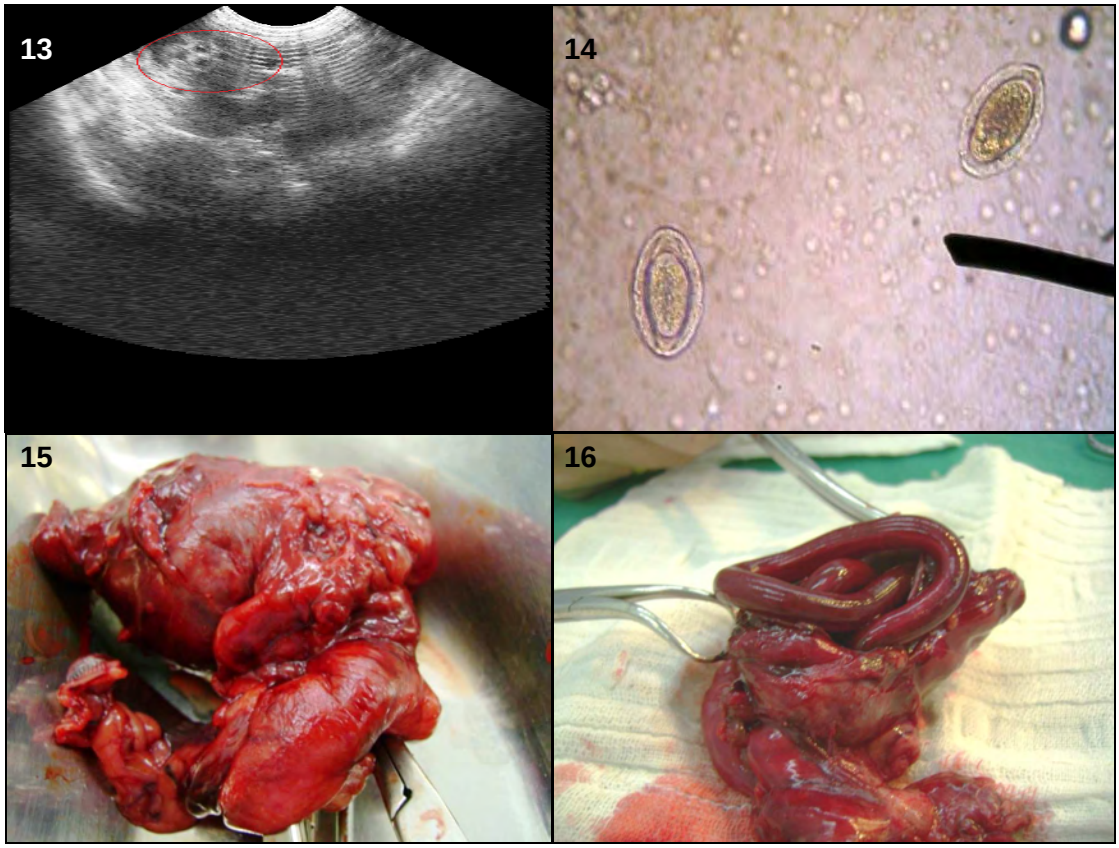
No cão infectado, neste estudo, a eliminação de ovos foi observada na urina 215 dias após a infecção experimental (Prancha IV - Figura 14). Entretanto, 60 dias antes, já foi possível sugerir o parasitismo neste animal em seu rim direito pelo exame de ultrassom, demonstrando o estabelecimento da infecção no cão pela ingestão de *C. ictericus* como hospedeiro paratênico, atendendo ao 3º e 4º Postulados de Koch (PELCZAR et al., 1996). No ultrassom, o parasito foi evidenciado como linhas hiperecogênicas com formatos arredondados, correspondendo a cortes transversais do helminto enovelado (Prancha IV - Figura 13). Nesse período, o animal manifestou dor na região lombar e durante a realização dos exames de ultrassom.

Para *Mustela vison*, infectados com hospedeiros paratênicos com L3, MACE e ANDERSON (1975) observaram eliminação de ovos na urina, 154 dias pós-infecção. Para *M. putorius,* esse período pode variar de 108 a 134 dias em animais experimentalmente infectados (MEASURES e ANDERSON, 1985). Karmanova em 1968 (citado por ANDERSON, 2000), indicou que o período pré-patente desse parasito, em cães, é de aproximadamente 135 dias; e VIGNAU et al. (2005) relataram que esse período pode variar de quatro a seis meses, enquanto para URQUHART et al. (1998), pode ser tão longo quanto dois anos. Nos hemogramas realizados, 30 e 60 dias após a infecção, os valores de ureia estiveram aumentados (71,6 e 62,2 mg/dL, respectivamente), passando para valores entre 33 e 45 mg/dL nos meses seguintes. Esses valores indicaram uma possível lesão renal, seguida de reação compensatória do rim esquerdo, que se apresentou hipertrofiado pelo ultrassom. Com relação aos eosinófilos, foi verificada eosinofilia apenas 120 e 150 dias após a infecção, representando, nesses períodos, 10% e 15%, respectivamente, do total de leucócitos circulantes. Os demais parâmetros da bioquímica renal, hemograma e urinálise apresentaram-se normais. Após confirmação do parasitismo, o animal foi submetido à nefrectomia direita, conforme procedimentos usuais. O rim removido estava disforme, friável, com cápsula mais delgada e neovascularizada. Ao ser incisado, verificou-se redução de camadas cortical e medular, que foram substituídas por tecido conjuntivo fibroso. Do seu interior fluiu pequena quantidade de sangue e nota-se um parasito fêmea com 52,5 cm de comprimento (Prancha IV - Figuras 15 e 16).

**PRANCHA II –** Figuras 7-9. Fotomicrografia de corte histológico de estômago de *Chaunus ictericus* naturalmente parasitados por larvas de terceiro estádio de *Dioctophyme renale*: Histopatologia (Coloração H&E) **(7)**; Larva submetida à IHQ com soro de camundongo não imunizado (controle negativo) **(8)**; Larva submetida à IHQ com soros de camundongo imunizado (controle positivo) (Sistema Polímero-peroxidase - HRP, 200x aumento) **(9)**.




**PRANCHA III -** Figuras 10-12. Fotomicrografia de corte histológico de estômago de *Chaunus ictericus* naturalmente parasitados por larvas de terceiro estádio de *Dioctophyme renale*: Larva marcada pela IHQ (Sistema Polímero-Peroxidase-HRP) **(10)**; Marcação negativa pela RIFIT **(11)**; Marcação positiva pela RIFIT (aumento 200x) **(12)**.




**PRANCHA IV -** Figuras 13-16. Imagens de *Dioctophyme renale* de cão experimentalmente infectado com larvas oriundas de *Chaunus ictericus* naturalmente parasitado: Imagem ultrassonográfica do rim direito parasitado (círculo com os cortes transversais do helminto) **(13)**; Ovos de *D. renale* observados na sedimentoscopia (160x) **(14)**; Abertura da cápsula renal para visibilização do parasito após nefrectomia **(15)**; Remoção do parasito do interior do rim direito **(16)**.

## 4. CONCLUSÕES

Na região geográfica avaliada, endêmica para a dioctofimatose canina, larvas de *D. renale* foram encontradas encistadas na parede gástrica de *C. ictericus*, indicando que essa espécie de anuro atua como hospedeiro paratênico e também como indicador ambiental da presença desse nematódeo. A larva de *D. renale* observada em *C. ictericus* foi infectante para cão, atingindo a fase adulta no rim direito.

Em peixes não foram encontradas larvas de *D. renale*, porém não se pode descartar a possibilidade de larvas serem observadas, se um maior número de peixes for avaliado, podendo assim verificar a importância dos peixes da região como hospedeiros paratênicos desse parasito.

Foi possível a imunomarcação das larvas do *D. renale* em tecido de hospedeiro paratênico naturalmente infectado, pelos métodos de imuno-histoquímica e imunofluorescência indireta em tecidos, utilizando-se soros de camundongos imunizados com antígeno produzido a partir de esôfago de formas adultas.

Este é o primeiro diagnóstico da larva infectante desse parasito, num hospedeiro paratênico no Brasil, e também o primeiro que se tem conhecimento na América do Sul.

**CAPÍTULO IV**

**ANTÍGENO SOMÁTICO DE ESÔFAGO DE HELMINTOS ADULTOS DE *Dioctophyme renale*: ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*D. renale* EM SOROS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS E CARACTERIZAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS PELA TÉCNICA DE "*WESTERN BLOTTING*".**

**SOMATIC ANTIGEN OF ESOPHAGUS OF ADULT HELMINTH *Dioctophyme renale*: ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY IN DETECTING ANTIBODIES IgG ANTI-*D. renale* IN SERA OF DOGS NATURALLY INFECTED AND CHARACTERIZATION OF POLYPEPTIDE BY WESTERN BLOTTING.**

**RESUMO** - O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de produzir um antígeno somático de esôfago de helmintos adultos de *Dioctophyme renale,* utilizá-lo na técnica de ELISA indireto para detecção de lgG específica em cães e realizar a caracterização dos polipeptídeos pela técnica de "*Western blotting*". Para obtenção do antígeno, quatro nematódeos adultos (1 macho e 3 fêmeas) foram lavados com solução salina estéril 0,9%, e removidos os esôfagos. Este órgão foi submetido à maceração, ciclos de congelamento e descongelamento e sonicação seguida de ultracentrifugação. Para o ELISA indireto, a concentração ótima de antígeno foi de 5μg/mL e, as diluições de soro e de conjugado que permitiram melhor discriminação entre soros de animais positivos e negativos foram, respectivamente, 1:100 e 1:7.000. A técnica de ELISA padronizada apresentou 92,3% de sensibilidade, 93,8% de especificidade, 93,6% de classificação correta e apenas 6,4% de classificação

incorreta, quando comparada à pesquisa de ovos do parasito em sedimento urinário. O índice Kappa foi de 0,76. A eletroforese em gel de poliacrilamida do antígeno produzido com o esôfago do *D. renale* evidenciou 15 frações proteicas, com as massas moleculares variando de 68 kDa a 10 kDa. A técnica de "*Western blotting*" demonstrou existirem componentes antigênicos e imunogênicos no antígeno produzido. Os camundongos imunizados com o antígeno reconheceram até 11 bandas, enquanto os camundongos-controles não apresentaram reatividade. Os soros de cães naturalmente infectados reconheceram até 24 bandas. As bandas protéicas de 8 kDa e 10 kDa devem ser importantes para o diagnóstico da dioctofimatose canina, em virtude da alta frequência de reconhecimento pelos soros dos camundongos imunizados com o antígeno do parasito e pelos soros de cães naturalmente parasitados, e pela ausência de reatividade com os soros dos camundongos controles e dos cães não reagentes pelo teste de ELISA.

**Palavras-chave:** *Dioctophyme renale,* cão, ELISA, "*Western blotting*", SDS-PAGE.

**ABSTRACT** – This work was developed with the purpose of producing a somatic antigen of esophageal helminth adults *Dioctophyme renale,* using it in an indirect ELISA for detection of specific IgG in dogs and perform the characterization of polypeptides by Western blotting. To obtain the antigen, four adult nematodes (1 male and 3 female) were washed with sterile saline 0.9% and the esophagus were removed. The esophagi were submitted to maceration, cycles of freezing and thawing and sonication followed by ultra-centrifugation. For the indirect ELISA, the optimum concentration of antigen was 5μg/mL, and the serum dilutions and conjugate which allowed better discrimination between positive and negative animal's sera were, respectively, 1:100 and 1:7,000. A standardized ELISA showed 92.3% sensitivity, 93.8% specificity, 93.6% correct classification and only 6.4% of misclassification when compared with eggs parasite detection in the urine sediment. The Kappa index was 0.76. The agarose gel electrophoresis of the antigen produced with the esophagus of *D. renale* revealed 15

protein fractions with molecular weights ranging from 68 kDa to 10 kDa. The technique of Western blotting showed that there are antigenic and immunogenic components in the antigen produced. The mice immunized with the antigen recognized 11 bands, while the control mice showed no reactivity. Sera from naturally infected dogs recognized 24 bands. The bands with peptides of 8 kDa and 10 kDa should be important for the diagnosis of canine dioctofimatose due to the high frequency of recognition by sera from mice immunized with antigen of the parasite and by sera from naturally infected dogs, and lack of reactivity with sera from control mice and from dogs who were negative by ELISA.

**Key words:** *Dioctophyme renale,* dog, ELISA, Western blotting, SDS-PAGE.

## 1. INTRODUÇÃO

Em regiões de clima frio e com abundância de recursos hídricos, normalmente o *Dioctophyme renale* é um parasito importante.

Os principais métodos de diagnóstico dessa afecção incluem a pesquisa de ovos do parasito na urina, a radiografia e a ultrassonografia (COSTA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2002). Nos casos de infecções somente com nematódeos machos, parasitos imaturos ou em localizações ectópicas, o exame de sedimento urinário não será capaz de detectar o parasitismo. Já a radiografia contrastada apenas evidencia o grau de comprometimento renal sem, entretanto, demonstrar o parasito. Para COSTA et al. (2004) e OLIVEIRA et al. (2005), a ultrassonografia é um método suficientemente sensível para sugerir a presença do parasito no parênquima renal, pela visualização de cortes transversais do nematódeo. Mas essa imagem característica é facilmente identificada, quando os parasitos já estão adultos, com extensa destruição do parênquima renal e, principalmente, quando o parasitismo é em rim.

Portanto, torna-se imprescindível conhecer as formas de interação entre esse helminto e seu hospedeiro, de modo a buscar novas alternativas de diagnóstico. Na

parasitologia veterinária, a utilização de métodos imunológicos para identificação de animais infectados é importante para melhorar a eficiência na detecção das diferentes doenças parasitárias que afetam os animais de companhia.

As infecções parasitárias caracterizam-se por estimular inúmeros mecanismos imunológicos de defesa, sejam eles mediados por anticorpos ou por células, e a eficiência das respostas depende do parasito em questão e do estágio de infecção (ROITT et al., 2003).

Assim, estudar a resposta imune em cães frente a esse nematódeo renal poderá fornecer informações a respeito dessa resposta, além de subsídio ao diagnóstico e de permitir o desenvolvimento de estudos epidemiológicos de prevalência. Todavia, ainda não existem metodologias padronizadas e nem *kits* comerciais para essas avaliações.

Com base no conhecimento de que a infecção por *D. renale* estimula o sistema imune humoral de cães, os objetivos do presente trabalho foram: produzir um antígeno solúvel de esôfago de helmintos adultos de *D. renale* e padronizar um Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) para detecção de lgG anti-*D. renale* em cães. Também foi realizada a caracterização do antígeno por eletroforese em gel de poliacrilamida e "*Western blotting*", utilizando-se soros de camundongos imunizados com o antígeno do parasito produzido e soros de cães naturalmente parasitados pelo *D. renale*. Os polipeptídeos reconhecidos por anticorpos séricos de cães naturalmente infectados foram comparados com os reconhecidos por anticorpos séricos de cães positivos pelo teste de ELISA, mas que não apresentavam eliminação de ovos do parasito pela urina.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. PRODUÇÃO DO ANTÍGENO

Para a produção do antígeno solúvel de *D. renale*, quatro helmintos adultos, um macho e três fêmeas, foram obtidos de cães naturalmente infectados e que foram a

óbito. Os nematódeos foram armazenados a -20$^{o}$C até o preparo do antígeno. Depois de lavados em solução salina 0,9%, para remover sangue, líquido inflamatório e contaminantes, foram dissecados em lupa para a remoção do esôfago. O esôfago foi lavado por 5 vezes em PBS pH=7,2 com EDTA 1mM, fragmentado com lâmina de bisturi estéril e macerado em placa de Petri com bastão de vidro. O material resultante foi submetido a sete ciclos de congelamento a -70ºC por 5 minutos e descongelamento em banho-maria a 37ºC e, a seguir, ao ultrassom (BRANSON Sonifier 250 - 20KHz, 1mA). Foram utilizados 20 ciclos por minuto, efetuando-se séries de 10 segundos com intervalos de 10 segundos por cinco minutos em banho de gelo. Os ciclos de congelamento e descongelamento e a sonicação objetivaram a ruptura celular para a liberação das proteínas citoplasmáticas. O material resultante foi ultracentrifugado por 30 minutos a 12.000 xg a 4ºC; e a seguir, foi recuperado o sobrenadante, o qual foi utilizado como antígeno solúvel. Este foi aliquotado em microtubos e estocado a -70ºC até o momento do uso. A concentração proteica do antígeno solúvel foi determinada pelo método do ácido bicinconínico, utilizando-se o *Kit* de Reagentes BCA (Pierce Chemical Company), de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 4.1).

## 2.2. TÉCNICA DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO

*Soros-controle*: Soros de cães naturalmente parasitados provenientes de Três Barras (SC), com presença de ovos do helminto na urinálise e/ou achado do parasito em necropsia, foram usados como controles positivos (n=13). Como controles negativos, foram utilizadas duas amostras de soro de cães de Jaboticabal (SP), região não endêmica para *D. renale,* e soros de cães provenientes de Três Barras (n=25), testados pelo método de sedimentação da urina e que não apresentaram ovos do *D. renale* e nem evidências de parasitismo por exame ultrassonográfico dos rins e da cavidade abdominal. Foram ainda testados, outros 54 soros de cães de Três Barras (SC), negativos pelo exame do sedimento urinário para pesquisa de ovos do parasito. As amostras sanguíneas foram colhidas por venopunção jugular, utilizando-se tubos do

tipo vacuntainer de 3 mL. O sangue, em seguida, foi centrifugado para a separação do soro. Os soros foram aliquotados e mantidos congelados a -20ºC até o uso.

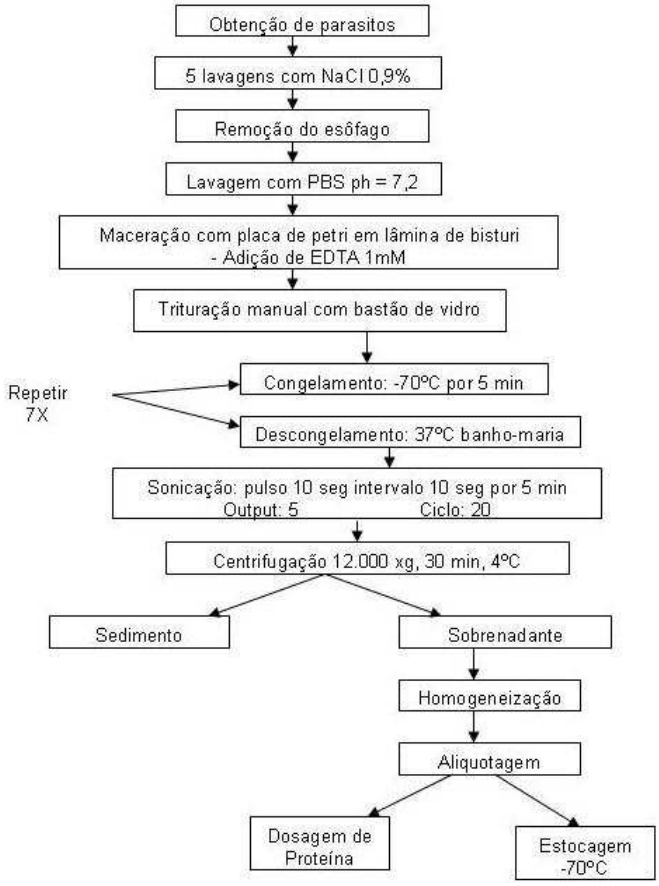



**Figura 4.1.** Fluxograma de procedimentos utilizados para obtenção do antígeno solúvel de esôfago de *Dioctophyme renale*.

*Padronização da Técnica de Ensaio Imunoenzimático para a detecção de IgG de cão anti-Dioctophyme renale*. O protocolo padronizado foi adaptado de MACHADO et al. (1997) e MINOZZO et al. (2004). O antígeno solúvel obtido foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6, até as concentrações de 2,5; 5; 10 e 20 µg/mL, que foram testadas na padronização. Em cada poço da placa (Nunclon, Cat nº 167008) adicionaram-se 100 µL do antígeno solúvel, sendo incubada por 12 a 14 horas, a 4ºC, em câmara úmida. A placa foi lavada três vezes com PBS 0,01M pH=7,4 contendo 0,05% de Tween 20 ou 80 (PBST). O bloqueio dos poços foi realizado com

200μL de solução de tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M pH=9,6, adicionado de 2% ou 6% de leite em pó desnatado, por 90 minutos, a 37ºC. O excesso de bloqueio foi removido por três lavagens com PBST.

Os soros-controles positivos e negativos foram diluídos (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1.600 e 1/3.200 vezes) em PBS Tween com 2% ou 6% de leite em pó desnatado, para bloqueio das reações inespecíficas. A cada poço foram adicionados 100 μL do soro diluído. As placas foram incubadas por 90 minutos a 37$^{o}$ C, em estufa, e depois lavadas três vezes com PBST.

O conjugado consistia de IgG de coelho anti–IgG de cão, conjugada com a enzima peroxidase (Sigma cat n$^{o}$ A6792). Este foi diluído em PBST com 5% de leite em pó desnatado e avaliado nas diluições de 1/5.000 e 1/7.000. Após adição de 100 μL por poço, a placa foi incubada, por 90 minutos, a 37ºC, e lavada conforme já descrito.

O ortofenilenodiamino - OPD (Sigma cat n$^{o}$ P6787) foi utilizado como substrato da enzima peroxidase (20 μg) com 0,02% de peróxido de hidrogênio em tampão citrato pH=5,0. Foram adicionados 100 μL da solução de substrato por poço das placas. Em seguida, as placas foram mantidas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos, para a revelação. A reação foi parada pela adição de 50μL de ácido sulfúrico a 2% por poço. Os valores de absorbância foram obtidos em leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology) com filtro de 490 nm.

O ponto de corte do teste ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das absorbâncias dos soros-controles negativos (n= 27).

*Método Epidemiológico e Estatístico:* Os resultados do ELISA indireto padronizado foram comparados aos do exame de sedimentação da urina (padrão ouro), com a finalidade de avaliação dos índices de sensibilidade (S), especificidade (E), valor de predição de positividade (VPP), valor de predição de negatividade (VPN), classificação correta, classificação incorreta e índice Kappa. Esses índices foram obtidos seguindo-se o modelo da matriz para avaliação de teste diagnóstico de PEREIRA (2002), com os cálculos efetuados pelo método do Crivo (BRAILE e GODOY, 1999). Nas avaliações

foram comparados os resultados do exame de urina e das análises de soros de 94 de cães provenientes de Três Barras, SC, e de Jaboticabal, SP.

A validade de um teste é expressa pelos valores de S e E. A sensibilidade é a capacidade que o teste apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente infectados; e a especificidade é a capacidade do teste de diagnosticar corretamente os indivíduos não infectados (PEREIRA, 2002). Os indicadores globais de concordância são expressos pela classificação correta e classificação incorreta. Eles servem para informar sobre o resultado geral da aplicação de um teste e sobre sua capacidade de refletir a real situação (PEREIRA, 2002). O VPP é a proporção de infectados entre os considerados positivos pelo teste, enquanto o VPN é a proporção de não infectados entre os considerados negativos pelo teste.

Os índices de S e E são propriedades estáveis do teste, pois não mudam com alterações na prevalência da infecção. O VPP, o VPN e a concordância são propriedades instáveis do teste, pois variam com a prevalência da infecção. O VPP aumenta com a prevalência da infecção, enquanto o VPN diminui (GUIMARÃES et al*.,* 1987; PEREIRA, 2002). Já o Kappa é um indicador de concordância ajustada, que informa a proporção de concordâncias além da esperada pelo fator chance, e varia menos. É expresso em valores que variam de zero (ruim) a um (perfeita) (PEREIRA, 2002).

## 2.3. CARACTERIZAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS

*Soros de cães e de camundongos:* para a caracterização proteica do antígeno de *D. renale*, foram utilizadas amostras de soros de cães e camundongos, divididas nos grupos:

Grupo 1 (G1): constituído por 28 amostras de soros de cães provenientes de Três Barras, SC, naturalmente parasitados por *D. renale* e com exame de urina positivo para a presença de ovos do parasito*.*

Grupo 2 (G2): constituído por 14 amostras de soros de cães provenientes de Três Barras, SC, com exame de urina negativo para a presença de ovos de *D. renale* e com soropositividade para *D. renale* pelo ELISA indireto.

Grupo 3 (G3): constituído por três amostras; duas de soros de cães provenientes de Três Barras, SC, com exame de urina negativo para a presença de ovos de *D. renale* e soronegativos para *D. renale* pelo ELISA indireto, e uma amostra de soro proveniente de um cão negativo para *D. renale* de Jaboticabal, SP.

Grupo 4 (G4a, G4b): constituído por seis amostras de soros de camundongos fêmeas Balb-c; dentre esses, três foram imunizados com o antígeno solúvel de esôfago de *D. renale* (G4a=C1, C2 e C3) e três animais-controles, que receberam apenas solução salina (G4b=C4, C5 e C6).

As amostras sanguíneas dos cães foram colhidas por venopunção jugular e as dos camundongos por punção cardíaca, utilizando-se tubos vacuntainer de 3 mL. O sangue foi centrifugado para a separação do soro, que foi aliquotado e mantido congelado a -20ºC até o uso.

*Caracterização das proteínas do antígeno solúvel de esôfago de D. renale em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):* O antígeno obtido foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por LAEMMLI (1970). O antígeno foi diluído em tampão da amostra quatro vezes concentrado (250mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, 20% β-mercaptoetanol e 0,008% de azul de bromofenol) e submetido à desnaturação proteica por fervura por 5 minutos. No gel, para a padronização, foram utilizadas concentrações proteicas de 10, 15, 25, 35 e 50µg de antígeno por canaleta. O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida em tampão (1,875 M Tris, pH 8,8 e 1% SDS) e de 5% de poliacrilamida para o gel de empilhamento em tampão (1,875 M Tris, pH 6,8 e 0,5% SDS). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-Glicina (50 mM Tris pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 200V por 80 minutos, com a cuba resfriada em banho de gelo, no sistema vertical Mini-Protean II (Bio-Rad). Após a corrida eletroforética para análise do perfil proteico, os géis foram corados sob baixa

agitação, por 12 a 14 horas, com a solução Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,05% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% de metanol e 10% de ácido acético). A descoloração dos géis foi realizada com solução descolorante (30% de metanol e 7% de ácido acético) sob baixa agitação por 40 minutos. O padrão molecular utilizado (BenchMark$^{TM}$ Protein Ladder - Invitrogen cat. n$^{o}$ 10747-012) consiste em 15 proteínas com o peso molecular variando de 10 kDa a 220 kDa. O peso molecular das frações proteicas foi estimado mediante construção de curvas padrões.

"*Western blotting*" (WB): utilizou-se a técnica descrita por TOWBIN et al. (1979). As frações proteicas do antígeno de *D. renale* separadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad), previamente incubada em tampão de transferência Tris-glicina gelado (Tris 0,025M, metanol 20% e glicina 0,192M). A transferência foi realizada a 100V, durante 60 minutos, no sistema de eletrotransferência vertical Mini Trans-Blot (Bio-Rad), contendo tampão de transferência gelado. A transferência foi visibilizada na membrana de nitrocelulose pela coloração com solução de Ponceau-S (0,1% Ponceau-S e 10% ácido acético), por 5 minutos, e descoloração em água destilada. A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas do antígeno foi cortada em tiras. As tiras foram, cada uma, submetidas ao bloqueio com solução TBST (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) acrescida de 5% de leite em pó desnatado, por 12 horas, sob baixa agitação. Essas tiras de nitrocelulose foram incubadas com as amostras de soros de cães e camundongos, diluídos 1:100, durante duas horas em temperatura ambiente, sob agitação lenta, e a seguir, lavadas três vezes por 10 minutos cada, com solução TBST. Foi então adicionado, a cada tira, conjugado anti-IgG de cão (Sigma cat n$^{o}$ A0793) ou anti-IgG de camundongo (Sigma cat n$^{o}$ A3562) acoplado à fosfatase alcalina, diluídos, respectivamente, a 1:10.000 e 1:30.000 em TBST, sob agitação por 90 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas três vezes com TBST por 5 minutos cada. As tiras foram incubadas por três a cinco minutos para o aparecimento das bandas, com o substrato da enzima, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/ 4-nitro-azul de

tetrazólio (BCIP/NBT), utilizando-se o *kit* substrato do conjugado fosfatase alcalina (Bio-Rad), de acordo com as recomendações do fabricante. As tiras foram então lavadas em água destilada para interromper a reação, e deixadas secar a temperatura ambiente. Na tranferência, foi utilizado o padrão molecular (PageRuler$^{TM}$ Prestained Protein Ladder - Fermentas cat. n$^{o}$ #SM 0671) com 10 proteínas com o peso molecular variando de 10 a 170 kDa. Todas as proteínas do antígeno reconhecidas pelas amostras de soro testadas foram analisadas. O peso molecular aparente de cada banda proteica reconhecida foi determinado, seguindo-se as seguintes etapas:

a) estimativa do tamanho do gel de separação do SDS-PAGE, tomando-se por base a distância total percorrida pelo padrão de peso molecular no gel; b) mensuração da distância percorrida por cada banda do peso molecular padrão, tomando-se como ponto de partida o início do gel de separação até a posição da banda; c) cálculo da mobilidade relativa (Rf) para cada banda do padrão de peso molecular e para cada banda do antígeno imunomarcada no WB (Distância percorrida ⁄ tamanho do gel); d) cálculo do logaritmo na base 10 para cada banda do padrão de peso molecular; e) plotagem de um gráfico, com os valores logarítmicos dispostos no eixo das abscissas, e os Rfs referentes ao padrão de peso molecular dispostos no eixo das ordenadas. Lançamento no mesmo gráfico dos Rfs de cada banda do antígeno imunorreativa no WB; f) Cálculo do antilogarítimo, a partir do valor traçado no gráfico para cada uma das bandas peptídicas reconhecidas pelo soro testado, que resultará no peso molecular aparente.

*Análise estatística:* os resultados obtidos nos grupos de soros no WB foram analisados pelo teste exato de Fisher para amostras independentes, usando-se o programa EPIINFO versão 3.4.3. O nível de significância aceito para todas as análises foi $p<0,05$.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1. TÉCNICA DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO

O antígeno solúvel produzido a partir do esôfago de formas adultas de *D. renale* apresentou uma concentração proteica de 1,255 mg/mL.

Helmintos parasitos geralmente possuem uma cutícula extracelular espessa, que protege a membrana plasmática hipodérmica; outros também possuem um revestimento frouxo que pode facilmente ser destacado quando atacado (TIZARD, 1998). Os antígenos da cutícula são diferentes em cada estádio evolutivo (ROITT et al., 2003), e, desse modo, soluções antigênicas produzidas da cutícula podem não ser tão efetivas na identificação de animais parasitados.

A penetração do *D. renale* nos tecidos do hospedeiro ocorre pela ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por suas glândulas esofágicas. Essa ação determina necrose de coagulação (AUGUSTO FILHO et al.,1999; NEVES et al., 1983) e tem como efeito final a destruição do rim. O esôfago possui um papel relevante na interação parasito/hospedeiro, razão pela qual foi selecionado para a produção do antígeno.

As concentrações de 5μg/mL e 10μg/mL não apresentaram diferenças marcantes nas absorbâncias dos soros-controles e estas permitiram uma discriminação entre os soros positivos e negativos. Pela quantidade de antígeno obtida, optou-se pela utilização de 5μg/mL de proteína de antígeno na placa (Figura 4.2).

CUQUERELLA et al. (1994) utilizaram a concentração de 5μg/mL de antígeno somático de $L_3$ e 10μg/mL de antígeno de parasitos adultos de *Haemonchus contortus* frente a soros de ovinos. Também GENNARI e TAIT (1992) utilizaram a concentração 5μg/mL de antígeno de adultos de *H. contortus.* Portanto, a concentração proteica utilizada neste trabalho apresenta similaridade com a utilizada pelos autores citados para o ELISA teste, usando antígenos de nematódeos.

Um antígeno obtido de produtos de secreção e excreção de formas adultas de *D. renale,* mantidas em meio de cultivo (PEDRASSANI et al., 2008b) e outro produzido por um *pool* de ovos do parasito foram também testados pelo teste de ELISA indireto. Esses antígenos não demonstraram reatividade expressiva contra soros de cães naturalmente parasitados pelo *D. renale*, resultando em valores de absorbância muito baixos (dados não mostrados).

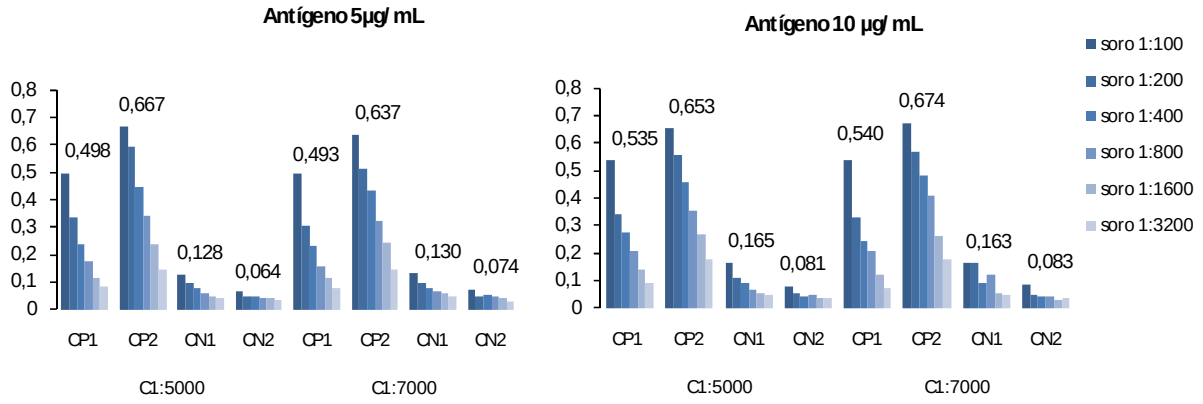
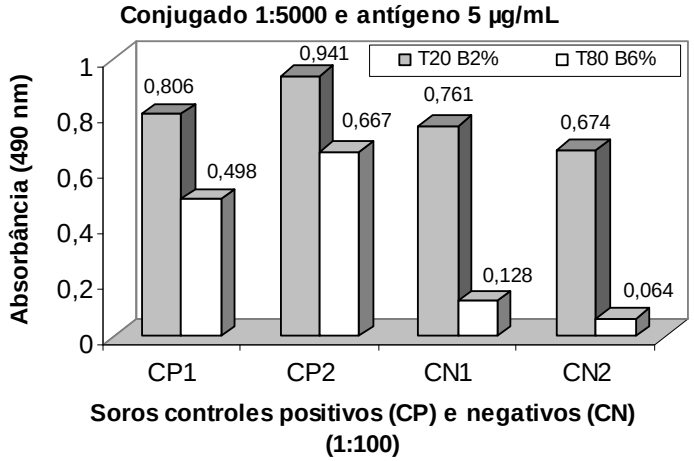



**Figura 4.2.** Valores de absorbância dos soros controles positivos e negativos para *Dioctophyme renale* nas diversas diluições em função da concentração de antígeno e diluição do conjugado.

Para MONTEIRO et al. (2007), o leite desnatado apresentou o melhor desempenho quando comparado com outras substâncias de bloqueio, como a albumina e a gelatina, proporcionando a melhor discriminação entre os valores de absorbância dos controles positivos e negativos para cisticercose bovina.

No presente trabalho, o leite em pó desnatado foi utilizado como substância de bloqueio e testado nas concentrações de 2% e 6%. Já o Tween, foi utilizado como substância detergente não iônica nas soluções de lavagem e como emulsificador, com a finalidade de diminuir as reações inespecíficas. Com o leite em pó desnatado a 2%, no bloqueio da placa, e o Tween 20, nas soluções de lavagem, quando testados com soro diluído 1:100, conjugado diluído 1:5.000 e antígeno em concentração de 5 µg/mL,

a média de absorbância dos controles negativos foi de 0,717, e a dos controles positivos foi de 0,873 (Figura 4.3). Essa combinação não foi capaz de diminuir as reações inespecíficas, apresentando “ruídos” e não proporcionando diferenciação entre os valores de absorbância dos soros controles positivos e negativos. Com o Tween 80 nas soluções de lavagens e leite em pó desnatado a 6% no bloqueio, mantidos os demais parâmetros, a média de absorbância dos controles negativos foi de 0,096, e a dos controles positivos foi de 0,583, possibilitando diferenciar, pelos valores de absorbância, os controles positivos dos negativos (Figura 4.3).




Legenda: (T20 B2%) - Tween 20 e solução de bloqueio com 2% de leite em pó desnatado.
(T80 B6%) - Tween 80 e solução de bloqueio com 6% de leite em pó desnatado.

**Figura 4.3.** Valores de absorbância dos soros controles positivos e negativos para *Dioctophyme renale,* diluídos 1:100 em função da solução de bloqueio e do Tween utilizado.

Para padronizar a diluição única de soro a ser empregada, diluições seriadas foram comparadas. A diluição de 1:50 resultou em valores de absorbância altos para os controles positivos (0,731 e 0,835), mas também altos para os controles negativos, especialmente para o controle negativo 1, cuja absorbância foi de 0,271.

Quando a diluição utilizada foi de 1:100, os valores de absorbância para os controles positivos foram entre 0,637 e 0,493, e o valor do controle negativo 1 foi de

0,130. A partir da diluição de 1:200, os valores de absorbância diminuíram muito, assim, a diluição única do soro foi utilizada foi 1:100 (Figura 4.2).

Nas infecções crônicas, os níveis de anticorpos tendem a ser menores. Cães com *D. renale* geralmente apresentam infecções crônicas e com pequeno número de helmintos e devem, portanto, apresentar títulos baixos de anticorpos anti-*D. renale*. Casos de alta intensidade de infecção são raros; o mais comum é apenas um ou dois helmintos parasitarem um hospedeiro (MONTEIRO et al., 2002; NAKAGAWA et al., 2007). Um dos soros controle positivo usado é proveniente de um animal que foi necropsiado e que apresentava um helminto fêmea, no rim direito. O rim possuía apenas a cápsula, indicando ser a infecção já crônica. O valor de absorbância do soro desse animal foi de 0,637, o qual foi um dos valores de absorbância mais elevados. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho sobre pesquisa de anticorpos anti-*D. renale*, não existindo possibilidade de comparação entre as diluições usadas. Para o nematódeo *H. contortus,* CUQUERELLA et al. (1994) também usaram a diluição de 1:100 com soros de ovinos para a detecção de lgG anti-*H. contortus;* já GENNARI e TAIT (1992) utilizaram a diluição de 1:50.

Um conjugado comercial foi utilizado para a padronização. Ao manter fixa a quantidade de antígeno em 5μg/mL e a diluição de soro em 1:100, o conjugado diluído 1:7.000 demonstrou valores de absorbância similares aos da diluição de 1:5.000. Para os controles positivos os valores foram de 0,498 e 0,667 com diluição de 1:5.000 e passaram para 0,493 e 0,637 com diluição de 1:7.000 (Figura 4.2). Como o conjugado é um dos reativos que mais oneram o ensaio imunoenzimático (MONTEIRO et al., 2007), optou-se pela diluição de 1:7.000, pois esta não diminuiu significativamente os valores de absorbância dos soros, não prejudicando a discriminação entre controles positivos e negativos.

No estabelecimento do ponto de corte, levou-se em consideração a finalidade para a qual o teste de ELISA indireto seria padronizado. Como a padronização foi desenvolvida para ser útil no diagnóstico de parasitismo por *D. renale* e menos frequentemente para a realização de estudos soroepidemiológicos de prevalência de anticorpos anti-*D. renale* optou-se por padronizar o método prezando pela sua

especificidade, para favorecer a detecção de animais não imunorreagentes. Então, no cálculo do ponto de corte foi usado o valor de duas vezes e meia o valor de absorbância dos soros-controles negativos.

Com a utilização dos seguintes parâmetros: 5μg/mL de concentração proteica do antígeno, soro diluído 1:100 e a diluição do conjugado em 1:7.000, a média de absorbância para os soros controles negativos foi de 0,132 ± 0,0372. Desse modo, o valor mínimo de absorbância para que a amostra fosse considerada reagente ao teste de ELISA ficou estabelecido em 0,330.

Para a determinação dos indicadores epidemiológicos, soros de 94 cães foram analisados pelo método de exame do sedimento da urina (padrão) e pelo teste de ELISA indireto padronizado neste trabalho, com os dados agrupados de acordo com a concordância ou não entre os resultados obtidos em ambos os métodos. Com o agrupamento desses resultados, foi montada a matriz para o cálculo dos indicadores epidemiológicos, para determinar a qualidade do método padronizado (Tabela 4.1).

Dos soros dos animais com exame de urina positivo, apenas um não apresentou reatividade no teste ELISA, pois apresentou absorbância de 0,260. Por outro lado, 5 cães considerados negativos no exame urinário apresentaram soros reativos pelo ELISA teste, com valores de absorbância de 0,373 a 0,509 (Tabela 4.1). Os valores de absorbância mais frequentes para os soros testados, estiveram na faixa de 0,150 a 0,299 (Figura 4.4).

**Tabela 4.1.** Comparação dos resultados obtidos com a análise de 94 soros de cães avaliados pelos métodos de sedimentação de ovos do parasito na urina (prova padrão) e ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti–*Dioctophyme renale*. Jaboticabal, SP, 2009.

| | | *Método de sedimentação de ovos na urina* | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **Infectado** | **Não Infectado** | **Total** |
| *ELISA Indireto* | **Infectado** | 12 | 05 | 17 |
| | **Não Infectado** | 01 | 76 | 77 |
| | **Total** | 13 | 81 | 94 |

O teste de ELISA indireto padronizado no presente trabalho apresentou os seguintes índices, conforme valores da Tabela 4.1:

- ✓ Sensibilidade: 92,3 % (IC 95%=77,8-106,8) e Especificidade: 93,8% (IC 95%=88,6-99,1);
- ✓ Classificação Correta: 93,6% (IC 95%=88,7-98,6) e Classificação Incorreta: 6,4%;
- ✓ VPP: 70,6% (IC 95%=48,9-92,2) e VPN: 98,7% % (IC 95%=96,2-101,2);
- ✓ Índice Kappa (K): 0,76 (IC 95%=0,58-0,95).

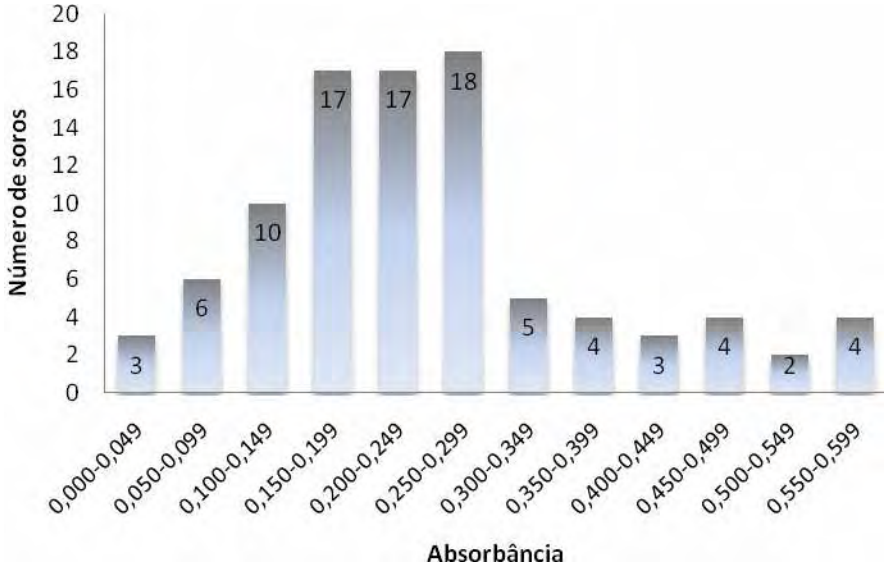



**Figura 4.4**. Valores de absorbância dos soros de cães utilizados na padronização do teste de ELISA indireto, para pesquisa de anticorpos anti-*D. renale*. Jaboticabal, SP, 2009.

O teste padronizado apresentou alta sensibilidade e especificidade. Os indicadores epidemiológicos obtidos neste trabalho não puderam ser comparados, pois não foram encontrados trabalhos similares. O VPP foi de 70,6% e o VPN foi 98,7%. O VPP ficou um pouco baixo, porém, levando-se em consideração que esse indicador varia em razão da prevalência da infecção, em regiões onde o parasito é frequente a tendência é que o VPP aumente.

O índice de classificação correta ou concordância bruta entre os métodos foi de 93,6%. Muitas vezes se observa que a concordância entre métodos não é perfeita, o que é esperado neste caso, pois um método detecta a eliminação de ovos do parasito

pela urina do hospedeiro, enquanto o outro pesquisa anticorpos contra o agente da dioctofimatose canina. Já o valor do Kappa (K), que é um indicador de concordância corrigido, foi de 0,76, classificado como bom e estando muito próximo de 0,8, que já é considerado ótimo.

A técnica de detecção de lgG anti-*D. renale* padronizada pode ser uma ferramenta auxiliar no diagnóstico de dioctofimatose em cães suspeitos, sempre associada aos sinais clínicos, laboratoriais e ao exame ultrassonográfico. Pode ser utilizada ainda em estudos epidemiológicos de prevalência deste helminto em populações caninas, auxiliando na identificação de cães que não estejam eliminando ovos do parasito junto com sua urina.

## 3.2. CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DO ANTÍGENO: SDS-PAGE E "*WESTERN BLOTTING*"

A corrida eletroforética do antígeno de esôfago do *D. renale* evidenciou a presença de 15 frações proteicas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), com as massas moleculares variando de 68 kDa a 10 kDa. A separação de proteínas apresentou melhor resolução no gel a 12% de poliacrilamida e com utilização do antígeno na concentração de 15µg por canaleta (Figura 4.5).

A caracterização do antígeno de *D. renale* produzido foi estudada pela técnica de WB, que foi realizada com o mesmo antígeno de esôfago de *D. renale* utilizado no ELISA indireto. O princípio das duas técnicas é basicamente o mesmo, entretanto a vantagem do WB está na capacidade de detectar especificamente as proteínas mais antigênicas dos extratos solúveis, quando confrontados com soros de pacientes.

Em todos os grupos de soros testados, foram encontrados perfis variados de imunomarcação, com o reconhecimento de proteínas com pesos moleculares aproximados que variaram de 7 kDa a 89 kDa (Tabela 4.2 e Figuras 4.6 a 4.9), sugerindo que diversas moléculas sejam responsáveis pela imunogenicidade desse parasito. SUDRÉ (2007), ao realizar a caracterização imunológica de antígenos do

nematódeo *Strongyloides stercoralis* em grupos de soros humanos, também verificou um amplo e heterogêneo grupo de moléculas imunogênicas.

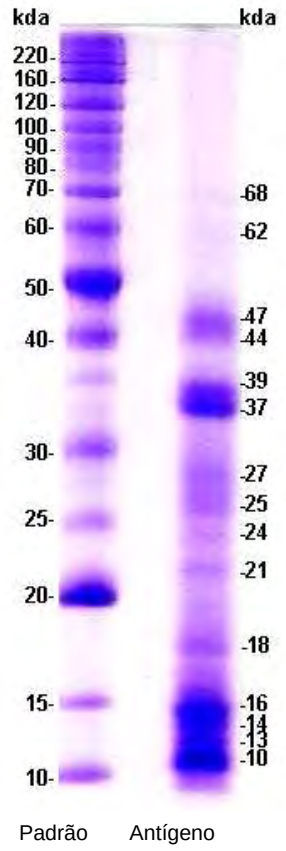



**Figura 4.5.** Corrida eletroforética do antígeno de esôfago de *Dioctophyme renale,* em gel a 12% de poliacrilamida. Gel corado pelo Comassie Blue.

Soros de camundongos imunizados (G4a) reconheceram de 8 a 11 bandas. As bandas de 75-76 kDa, 65-69 kDa, 62-63 kDa, 49-53 kDa, 46-47 kDa, 37-39 kDa, 27-28 kDa e 14 kDa foram reconhecidas por 100% dos soros de camundongos imunizados (G4a). Já para as bandas de 10 kDa, 8 kDa e 7 kDa o reconhecimento foi de 67%. As bandas mais evidentes na membrana foram as de 27-28 kDa e 37-39 kDa. No G4b (camundongos controles), e os soros não apresentaram nenhuma reatividade com o antígeno (Tabelas 4.2 e 4.4 e Figura 4.6).

Os soros de cães naturalmente parasitados (G1) reconheceram de 5 a 11 bandas. Uma banda de 75-76 kDa e outra de 10 kDa foram reconhecidas pelos soros de 89,3% dos cães do G1, a de 49-53 kDa por 85,7%, a de 16 kDa por 78,6%, a de 37-39 kDa por 71,4% e as de 14 kDa e 8kDa por 64,3%. Outras 17 bandas que foram evidenciadas com menor frequência pelos soros de cães do G1 estão listadas na Tabela 4.2. As bandas de peso molecular aproximado de 49-53 kDa e 37-39 kDa foram as mais intensamente marcadas (Figura 4.7).

Os soros dos cães reagentes no ELISA indireto (G2) reconheceram de 4 a 10 bandas. As bandas de 10 kDa (73,3%) e 8 kDa (86,6%) foram as reconhecidas pelo maior número de soros. No G2, as bandas de 89 kDa e 49-53 kDa foram reativas com 53,3% dos soros, e as de 65-69 kDa, 46-47 kDa, 37-39 kDa e 16 kDa com 40% dos soros. Nesse grupo, a banda mais evidente na membrana, foi a de 49-53 kDa (Figura 4.8). As outras bandas reconhecidas com menor frequência pelos soros de cães do G2 estão listadas na Tabela 4.2.

A produção do antígeno apenas com o esôfago deve ter proporcionado a eliminação de substâncias pouco específicas, que estariam presentes no antígeno caso esse fosse produzido a partir do organismo inteiro do helminto. Esse aspecto pode ter colaborado para que, nos grupos avaliados, um pequeno número de bandas tenha sido reconhecido pelos soros (G4a de 8 a 11 bandas e, G1 e G2 de 4 a 11 bandas).

Com relação aos soros dos cães não reagentes no teste de ELISA indireto (G3), 2 soros apresentaram bandas pouco evidentes na membrana, um reconheceu 3 e o outro 5 bandas, com pesos moleculares diferentes entre os soros. O soro do animal de Jaboticabal, SP, não reconheceu nenhum peptídeo do antígeno testado (Figura 4.9). Este era um animal de área não endêmica para *D. renale,* apresentava exame de fezes negativo para pesquisa de helmintos e era mantido em canil experimental. Os soros dos animais negativos, oriundos de Três Barras-SC, área onde é frequente o parasitismo por *D. renale*, apresentaram de três a cinco bandas reativas; destas, três apresentaram reatividade nos outros grupos também. Uma banda de 65-69 kDa foi reconhecida pelo soro de um dos animais e também pelo soro de todos os camundongos G4a, por 53,5% dos soros de cães do G1 e por 40% dos soros de cães

do G2 (Tabela 4.2). A banda de 27-28 kDa que foi reconhecida pelo soro de um dos animais também foi reconhecida pelo soro de todos os camundongos do G4a. A banda de 85-86 kDa que o soro de um animal reconheceu foi também identificada pelo soro de um animal do G1 (Tabelas 4.2 e 4.3). As demais bandas reveladas não foram identificadas pelos outros grupos analisados.

A reatividade no G3, com bandas de peso molecular similar ao das reconhecidas pelos soros dos camundongos imunizados ou pelos soros dos cães dos grupos G1 e G2 pode indicar prévio contato desses cães com o *D. renale* sem que a infecção tenha se estabelecido. Pode, ainda, ser resultado de reação inespecífica pela presença de outros nematódeos que apresentem epítopos similares.

O peptídeo de 75-76 kDa foi reconhecido por 100% dos soros dos camundongos imunizados (G4a) e por 89,3% dos soros dos cães do G1. Para os soros dos cães do G2, o reconhecimento dessa banda foi apenas de 23%. Estatisticamente, a banda foi mais reconhecida pelos grupos G1 ($p<0,0001$) e G4a ($p=0,0245$), quando comparados ao G2. Este peptídeo não foi reconhecido pelos animais soronegativos pelo ELISA indireto (G3).

O peptídeo com 49-53 kDa foi reconhecido por 100% dos soros dos camundongos G4a, 85,7% dos soros dos cães do G1 e por 53,3% dos soros do G2. Este peptídeo não foi reconhecido pelos soros dos animais do G3 e do G4b (Tabela 4.4). Não houve diferença significativa no percentual de reconhecimento entre os soros de camundongos imunizados e os grupos de soros de cães (G1 e G2), porém o peptídeo com 49-53 kDa foi significativamente mais reconhecido pelos soros do G1 do que do G2 ($p=0,0306$).

O peptídeo de 37-39 kDa não apresentou diferença estatística significativa, nos percentuais de reconhecimento entre os grupos em que foi detectado pelos soros analisados (G4a, G1 e G2). Esse peptídeo não foi reconhecido pelos soros dos cães negativos no ELISA indireta (G3).

A banda de 16 kDa foi reconhecida apenas pelos soros de cães (78,5% no G1 e 46,1% no G2), significativamente mais pelos soros do G1 ($p=0,0188$), sem ser reconhecida pelos soros do G3. Já o peptídeo de 14 kDa foi reconhecido pelos soros

dos cães do G1 (64,2%) e pelos soros dos camundongos imunizados G4a (100%), não havendo diferença entre os grupos (p=0,5328). O peptídeo de 89 kDa só foi reconhecido pelos soros de animais do G2 (53,3%) (Tabela 4.4).

Entre os soros de cães positivos (G1), foi observada alta frequência de reatividade para as bandas proteicas de aproximadamente 75-76 kDa (25/28), 49-53 kDa (24/28), 14 kDa (18/28), 10 kDa (25/28) e 8 kDa (18/28), que também foram imunorreativas com os soros dos camundongos imunizados (G4a) (Tabela 4.4).

Os peptídeos com 8 kDa e 10 kDa foram reconhecidos por 67% dos soros dos camundongos imunizados (G4a), mas foram os com maior percentual de reconhecimento pelos soros dos cães. No G1, 89,3% dos soros reconheceram o peptídeo de 10 kDa, e 64,2% desses, o de 8 kDa; e nos do G2, os percentuais de reconhecimento foram de 73,3% e 86,6%, respectivamente, não havendo diferença estatística em relação a essas duas bandas quando comparados os grupos (Tabela 4.4). Essas bandas não foram reconhecidas pelos soros dos cães negativos pelo ELISA indireta (G3), nem pelos soros dos camundongos não imunizados pelo antígeno (G4b).

Como com os soros de cães do G2, as bandas mais frequentemente reconhecidas foram as de 10 kDa e 8 kDa, que também foram bastante reconhecidas com os soros do G1 e do G4a essas bandas podem ser específicas do parasito e indicar que os animais do G2 podem já ter apresentado a dioctofimatose ou prévio contato com o parasito, sem estabelecimento de infecção. Ainda, a negatividade no exame de urina, nos animais do G2, pode ser devida à infecção apenas por parasitos machos, parasitos imaturos ou em localização errática. O soro de um animal do G2 apresentou bandas pouco evidentes na membrana, embora no ELISA indireto sua absorbância tenha sido de 0,509 (Tabela 4.4).

Sugere-se que as bandas com peptídeos com 8 e 10 kDa são importantes para o diagnóstico da dioctofimatose, em decorrência da sua alta frequência nos grupos G1, G2 e G4a e ausência nos grupos G3 e G4b. Essas proteínas podem ser isoladas e analisadas contra soro com anticorpos específicos, para melhor avaliação de sua reatividade.

Se forem considerados, na avaliação da reatividade das bandas, apenas os cães positivos pelo exame de urina (G1), as bandas reativas mais importantes foram as de 75-76 kDa (reativa também no G4, significativamente menos reativa no G2 e não reconhecida no G3) e 14 kDa (reativa também em G4 e não reativa no G2 e no G3), as quais devem também ser consideradas.

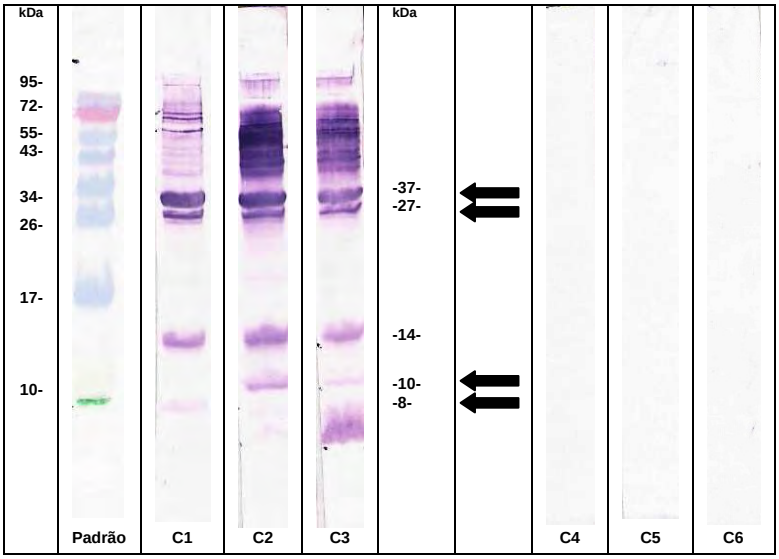



**Figura 4.6.** Ensaio de "*Western blotting*" com soros de camundongos Balb-c (G4). C1 a C3: camundongos imunizados com antígeno de *Dioctophyme renale* (G4a). C4-C6: camundongos não imunizados (controles negativos) (G4b).

**Tabela 4.2.** Número de bandas proteicas reconhecidas na pesquisa de anticorpos com antígeno de *Dioctophyme renale* no soro de camundongos e cães pela técnica de "*Western blotting*".

| ***Peso Molecular*** | **Número de soros que reconheceram** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **kDa** | **G1 (n=28)** | **G2 (n=15)** | **G3 (n=3)** | **G4a (n=3)** | **G4b (n=3)** |
| 89 | - | 08 | - | - | - |
| 85-86 | 03 | 02 | - | - | - |
| 82-83 | 01 | - | 01 | - | - |
| 80 | - | 02 | - | - | - |
| 77 | - | - | 01 | - | - |
| 75-76 | 25 | 03 | - | 03 | - |
| 72 | 01 | 01 | - | - | - |
| 65-69 | 15 | 06 | 01 | 03 | - |
| 62-63 | 15 | 03 | - | 03 | - |
| 59 | 02 | 01 | 01 | - | - |
| 55-56 | 01 | 02 | 01 | - | - |
| 49-53 | 24 | 08 | - | 03 | - |
| 46-47 | 09 | 06 | - | 03 | - |
| 42-44 | 03 | 03 | - | - | - |
| 40-41 | 02 | - | 01 | - | - |
| 37-39 | 20 | 06 | - | 03 | - |
| 33-35 | 01 | 01 | 01 | - | - |
| 30-32 | 02 | - | - | - | - |
| 27-28 | 05 | - | 01 | 03 | - |
| 24-25 | 08 | 01 | - | - | - |
| 18-20 | 03 | 04 | - | - | - |
| 16 | 22 | 06 | - | - | - |
| 14 | 18 | - | - | 03 | - |
| 13 | 05 | - | - | - | - |
| 10 | 25 | 11 | - | 02 | - |
| 8 | 18 | 13 | - | 02 | - |
| 7 | 01 | - | - | 02 | - |

**Tabela 4.3.** Frequência das bandas reativas no "*Western blotting*" dos soros dos cães positivos para *Dioctophyme renale* (G1).

| | | Peso molecular aproximado das bandas reativas no "Western blotting" (kDa) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Grupo** | **Soro** | **89** | **85-86** | **82-83** | **80** | **75-76** | **77** | **72** | **65-69** | **62-63** | **59** | **55-56** | **49-53** | **46-47** | **42-44** | **40-41** | **37-39** | **33-35** | **30-32** | **27-28** | **24-25** | **18-20** | **16** | **14** | **13** | **10** | **8** | **7** |
| **G1** | 16E | | | | | X | | | X | | | | | | | X | X | | | | X | | X | X | X | X | X | |
| | 15E | | | | | X | | | | X | | | X | | | | | | | | | | X | X | | X | | |
| | 62M | | | | | X | | | X | | X | | X | X | X | | | | | | | | X | | | | | |
| | 40M | | X | | | | | | | | | | X | | X | | X | | | | | | X | | | X | X | |
| | 13E | | | | | X | | | X | X | | | X | X | | | X | | | | | X | X | X | | | | |
| | 15M | | X | | | | | | X | X | | | X | | | | | | | | | | X | | | X | X | |
| | 88M | | X | | | | | | X | X | | | X | | | | X | | | | | | | | | X | X | |
| | 26E | | | | | X | | X | | | | | X | X | | | X | | | | | | | X | | X | X | |
| | 26M | | | | | X | | | X | X | | | X | X | | | X | | | | | | X | X | | X | | |
| | 98M | | | | | X | | | X | X | | | X | X | | | X | | | | | | X | | | X | X | |
| | 33E | | | | | X | | | | | | | X | | | | X | | | | | | | | | X | X | |
| | 11E | | | | | X | | | X | | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | X | |
| | 86M | | | | | X | | | X | | | | X | | | | X | | | | | | X | X | X | X | X | |
| | 25M | | | | | X | | | X | X | | X | | | | X | X | | | | | | X | X | | X | | |
| | 54E | | | | | X | | | X | | | | X | | | | X | | | | X | | X | X | | | | |
| | 2M | | | | | X | | | X | | X | | X | | X | | | | | X | | | X | X | | X | X | X |
| | 43M | | | | | X | | | | X | | | X | | | | X | | | | X | X | X | X | | X | X | |
| | 91M | | | | | X | | | X | | | | X | | | | X | | | X | | | | X | | X | | |
| | 24E | | | | | X | | | | X | | | X | | | | | | X | | | | | | | X | | |
| | 38M | | | | | X | | | | X | | | X | X | | | X | X | | | X | X | | X | | X | X | |
| | 29E | | | | | X | | | | X | | | X | | | | | | | | | | X | X | | X | X | |
| | 35M | | | | | X | | | | X | | | | X | | | X | | | X | | | X | | | X | X | |
| | 59E | | | | | X | | | | X | | | X | X | | | X | | | X | | | X | | | X | | |
| | 13M | | | | | X | | | | X | | | X | X | | | X | | | | X | | X | X | | X | | |
| | 20E | | | | | X | | | X | | | | X | | | | X | | | | X | | X | X | X | X | X | |
| | 29M | | | | | X | | | | | | | X | | | | X | | X | | X | | X | | | X | X | |
| | 42M | | | | | X | | | X | | | | X | | | | X | | | | X | | X | X | X | X | X | |
| | 34M | | | X | | X | | | | X | | | X | | | | | | | X | | | X | X | | X | X | |

**Tabela 4.4.** Frequência das bandas reativas no *"Western blotting"* dos soros dos cães negativos pela pesquisa de ovos na urina e positivos pelo exame de ELISA indireto para *Dioctophyme renale* (G2), soros de cães negativos para *D. renale* (G3) e camundongos imunizados e controles (G4).

| | | Peso molecular aproximado das bandas reativas no "Western blotting" (kDa) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Grupo** | **Soro** | **89** | **85-86** | **82-83** | **80** | **75-76** | **77** | **72** | **65-69** | **62-63** | **59** | **55-56** | **49-53** | **46-47** | **42-44** | **40-41** | **37-39** | **33-35** | **30-32** | **27-28** | **24-25** | **18-20** | **16** | **14** | **13** | **10** | **8** | **7** |
| | 52E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 37E | | | | | | | X | | | | | X | | | | | | | | | | | | | X | X | |
| | 42E | | | | | X | | | | X | | | X | | | | X | | | | | | | | | | X | |
| | 23E | | X | | | | | | X | X | | | | X | X | | | X | | | X | X | X | | | X | | |
| | 56E | | X | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | X | X | | | | X | |
| | 12M | | | | | X | | | | | X | | | | | | | | | | | | | | | X | X | |
| | 8M | | | | | X | | | | | | | X | | | | | | | | | | X | | | X | X | |
| | 104 | X | | | | | | | | | | | X | | X | | X | | | | | X | | | | X | X | |
| | 21M | X | | | X | | | | X | | | | X | X | | | X | | | | | | | | | X | X | |
| | 23M | X | | | | | | | | | | | X | X | | | X | | | | | | | | | X | X | |
| | 28M | X | | | | | | | X | | | X | | X | | | | | | | | | | | | X | X | |
| | 37M | X | | | X | | | | X | | | | | X | | | X | | | | | X | X | | | X | X | |
| | 24M | X | | | | | | | X | | | | | X | X | | | | | | | | | | | | X | |
| | 36M | X | | | | | | | | | | | X | | | | X | | | | | | X | | | X | X | |
| **G2** | 27M | X | | | | | | | X | | | X | X | | | | | | | | | | X | | | X | X | |
| | 115 | | | X | | | | | X | | X | | | | | X | | | | X | | | | | | | | |
| | 113 | | | | | | X | | | | | X | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| **G3** | CN | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | C1 | | | | | X | | | X | | | | X | X | | | X | | | X | | | | X | | | X | |
| | C2 | | | | | X | | | X | X | | | X | X | | | X | | | X | | | | X | | X | X | X |
| | C3 | | | | | X | | | X | X | | | X | X | | | X | | | X | | | | X | | X | | X |
| | C4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | C5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **G4** | C6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

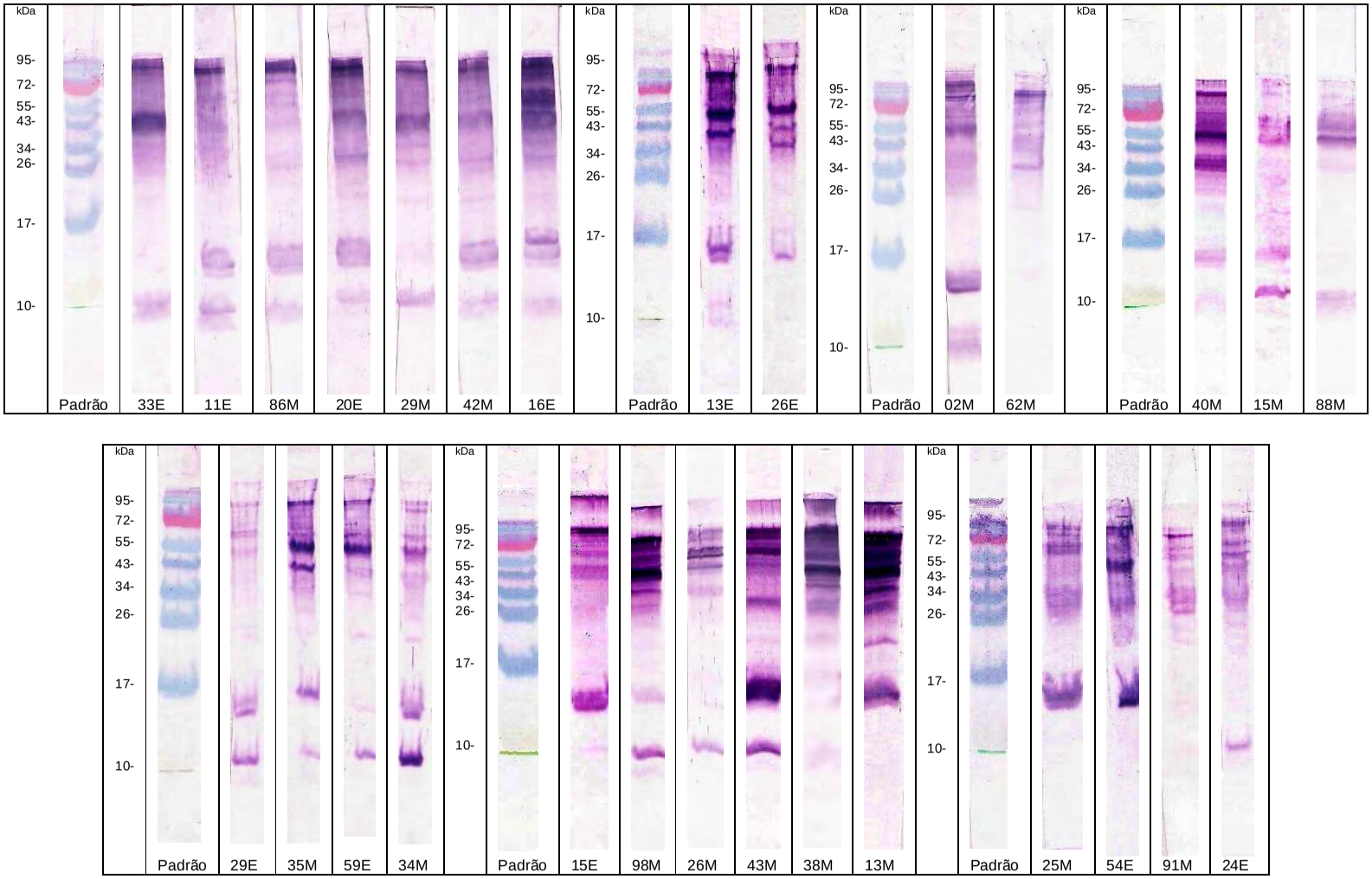



**Figura 4.7.** Ensaio de "*Western blotting*" com soros de cães naturalmente parasitados com *Dioctophyme renale* e com exame de urina positivo para pesquisa de ovos do parasito (G1).

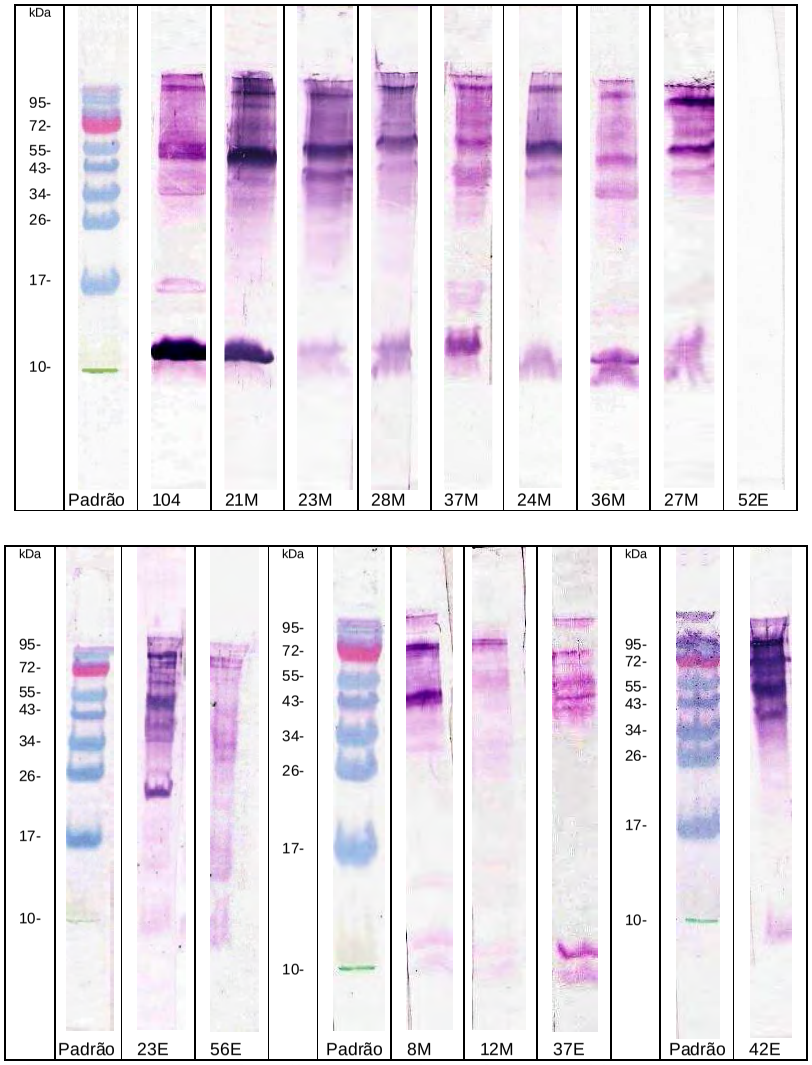



**Figura 4.8.** Ensaio de "*Western blotting*" com soros de cães suspeitos de parasitismo por *Dioctophyme renale*, com exame de urina negativo para pesquisa de ovos do parasito e ELISA indireto positivo (G2).

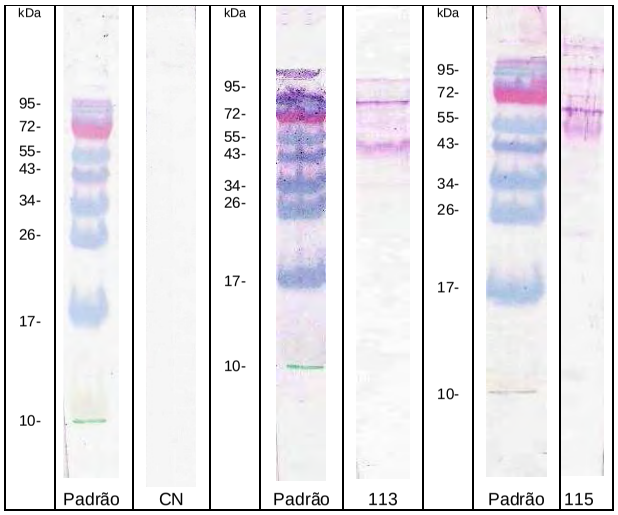



**Figura 4.9.** Ensaio de "*Western blotting*" com soros de cães negativos para *Dioctophyme renale* pelo exame de urina para pesquisa de ovos do parasito e pelo ELISA indireto positivo (G3).

## 4. CONCLUSÕES

É possível realizar a produção de antígeno a partir de esôfago de nematódeos adultos de *D. renale*, bem como sua utilização nos testes de ELISA indireto e WB. No teste de ELISA indireto este antígeno apresentou melhores resultados na concentração proteica de antígeno de 500 ng por poço.

Anticorpos contra esse antígeno foram detectados pelo ELISA indireto no soro de cães naturalmente parasitados pelo *D. renale*, indicando que a infecção pode estimular o sistema imune de cães.

O método de WB foi usado pela primeira vez neste estudo e demonstrou existirem componentes antigênicos e imunogênicos no antígeno produzido a partir do esôfago de formas adultas de *D. renale*. Camundongos imunizados com o antígeno de *D. renale* e cães naturalmente parasitados apresentaram evidências de algumas bandas similares pelo WB.

As bandas protéicas de 8 kDa e 10 kDa devem ser importantes para o diagnóstico da dioctofimatose canina, em virtude da alta frequência de reconhecimento pelos soros dos camundongos imunizados com o antígeno do parasito e pelos cães naturalmente parasitados, e pela ausência de reatividade com os soros dos camundongos controles e cães não reagentes pelo teste de ELISA.

**CAPÍTULO V**

# PARASITISMO POR *Dioctophyme renale* EM CÃES DO DISTRITO DE SÃO CRISTÓVÃO, TRÊS BARRAS, SC: PREVALÊNCIA E FATORES CONDICIONANTES.

# *Dioctophyme renale* PARASITISM BY DOGS IN THE SÃO CRISTÓVÃO DISTRICT, TRÊS BARRAS COUNTY, SANTA CATARINA STATE: PREVALENCE AND DETERMINANTS.

**RESUMO** - *Dioctophyme renale* é um nematódeo observado parasitando rim, cavidade peritoneal e mais raramente outros órgãos de canídeos e mustelídeos. Esta parasitose tem ocorrência elevada no Município de Três Barras - SC, tornando essa área interessante para o estudo de aspectos epidemiológicos da infecção por *D. renale* em cães. De 197 cães examinados, 14,2% apresentaram ovos do parasito na urina e 16,4% apresentaram anticorpos anti-*D. renale* no soro pelo método de ELISA indireto. O parasitismo foi mais frequente nas fêmeas, e não houve constatação de interferência da idade no parasitismo. O potencial hídrico e de hospedeiros paratênicos da região estudada foram fatores que contribuíram para a ocorrência do parasitismo.

**Palavras-chave:** cães, *Dioctophyme renale*, prevalência.

**ABSTRACT** - *Dioctophyme renale* is a nematode that can be found parasitizing the kidney, peritoneal cavity and seldom other organs of canids and mustelids. This disease has a high occurrence in Três Barras municipality, Santa Catarina state, making this an interesting area to study the epidemiological aspects of infection by *D. renale* in dogs. Of

197 dogs 14.2% showed the parasite eggs in urine and 16.4% had anti-*D. renale* in serum by the method of indirect ELISA. Parasitism was more frequent in females, and there was no finding of interference of age on parasitism. Water potential and the region hosts paratenic were studied factors that contributed to the occurrence of parasitism.

**Key words:** dogs, *Dioctophyme renale*, prevalence.

## 1. INTRODUÇÃO

*Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782) é um nematódeo de distribuição mundial que pode ser encontrado parasitando rim, cavidade peritoneal e mais raramente outros órgãos de canídeos e mustelídeos (ANDERSON, 2000). Seu ciclo de vida classicamente envolve um hospedeiro intermediário aquático e pode envolver a presença de hospedeiros paratênicos, como peixes e anuros; além disso, leva diversos meses para se completar (ANDERSON, 2000; DYER, 1998). Em cães, a infecção tipicamente envolve o rim direito, resultando na substituição do parênquima renal por um nematódeo maduro envolto pela cápsula fibrosa do órgão. Os cães parasitados podem eliminar ovos na urina. Estes ovos são detectados no exame do sedimento urinário. De acordo com WOODHEAD (1950), características como espessura, deformidades na casca e não estarem embrionados são típicas de ovos de Dioctophymatoidea. Os ovos de *D. renale* são ovais, têm coloração marrom-clara a amarela quando removidos da urina e o tamanho varia de 60-80 μm X 39-46 μm (FREITAS, 1980; COSTA et al., 2004).

Embora a infecção frequentemente persista por grande parte da vida do animal, o envolvimento de ambos os rins, migrações do parasito pela cavidade peritoneal ou inflamações associadas com a condição parasitária podem resultar na morte do hospedeiro (DYER, 1998). Apesar de possuir ampla distribuição, as prevalências diferem conforme a região avaliada, variando de 0,49% a 3,57% em diferentes Estados brasileiros (KOMMERS et al., 1999; LEITE et al., 2005; NEVES et al.,1983, PEREIRA et

al., 2006). No Distrito de São Cristóvão, Três Barras (SC), 30% dos cães necropsiados entre 2000 e 2003 estavam parasitados por *D. renale* (PEDRASSANI e CAMARGO, 2004). Em função dessa alta prevalência em necropsias, objetivou-se verificar a prevalência de cães parasitados pelo exame de urina, se os cães parasitados estão atuando como hospedeiros definitivos que permitam a continuidade do ciclo evolutivo, pela eliminação de ovos férteis do parasito pela urina e que fatores podem favorecer o parasitismo na região. Além disso, amostras de soros de cães foram analisadas para determinar a soroprevalência de anticorpos anti-*D. renale* nessa população.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. ÁREA DE ESTUDO

O Distrito de São Cristóvão pertence ao Município de Três Barras (SC), e sua população corresponde a 46,13% da população do município (IBGE, 2007) (Figura 5.1). Embora pertença à zona territorial urbana, possui algumas características transitórias de zona rural, além da peculiaridade de abranger a população menos favorecida do município (LIMA, 2007). É considerada uma região com condições socioeconômicas desfavoráveis, sem coleta de esgoto e com a maioria das ruas sem pavimentação asfáltica (IBGE, 2000). A vegetação original da região é classificada como Floresta Ombrófila Mista (IBGE, 1992). Atualmente, ainda restam características da composição florística original, embora a situação ambiental seja precária, em relação às águas e à vegetação sobre as margens (FOSSATI et al., 2006).

## 2.2. POPULAÇÃO DE CÃES

Trata-se de estudo transversal no qual 197 cães, sem raça definida, aparentemente saudáveis, de diferentes idades, machos e fêmeas e domiciliados no Distrito São Cristóvão, foram selecionados e conduzidos ao Hospital Veterinário da Universidade do Contestado para a coleta de amostras de sangue, urina e para realização de ultrassonografia pélvica, mediante consentimento do proprietário. Para a composição dessa amostra, o distrito foi dividido em quatro regiões. De cada região foi obtida uma amostra aleatória simples, por sorteio de ruas e residências a serem visitadas. Todos os cães da residência foram incluídos na amostra. Como não há censo canino na região, a população total de cães a ser pesquisada foi estimada com base na razão entre a população canina e população humana, conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde e pelo Instituto Pasteur, que consideram que em países emergentes essa proporção média varia de 1:10 a 1:6, podendo ser de até 1:1 (REICHMANN et al., 1999, WHO, 1990). Assim, por visitas a 100 domicílios do Distrito e com o auxílio de um questionário, com perguntas sobre o número de pessoas e de cães na residência, ficou determinada a proporção de 1:5, usada no cálculo da amostra de cães. Como a população do Distrito é de 8.275 habitantes (IBGE, 2007), a população estimada de cães ficou em 1.655 animais. A amostra foi calculada no Programa Epi Info 3.4.3, com um erro amostral de 6% e intervalo de confiança de 95%, ficando estabelecida em 197 cães. Este trabalho obteve parecer favorável nº 067/2006 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Contestado - UnC.

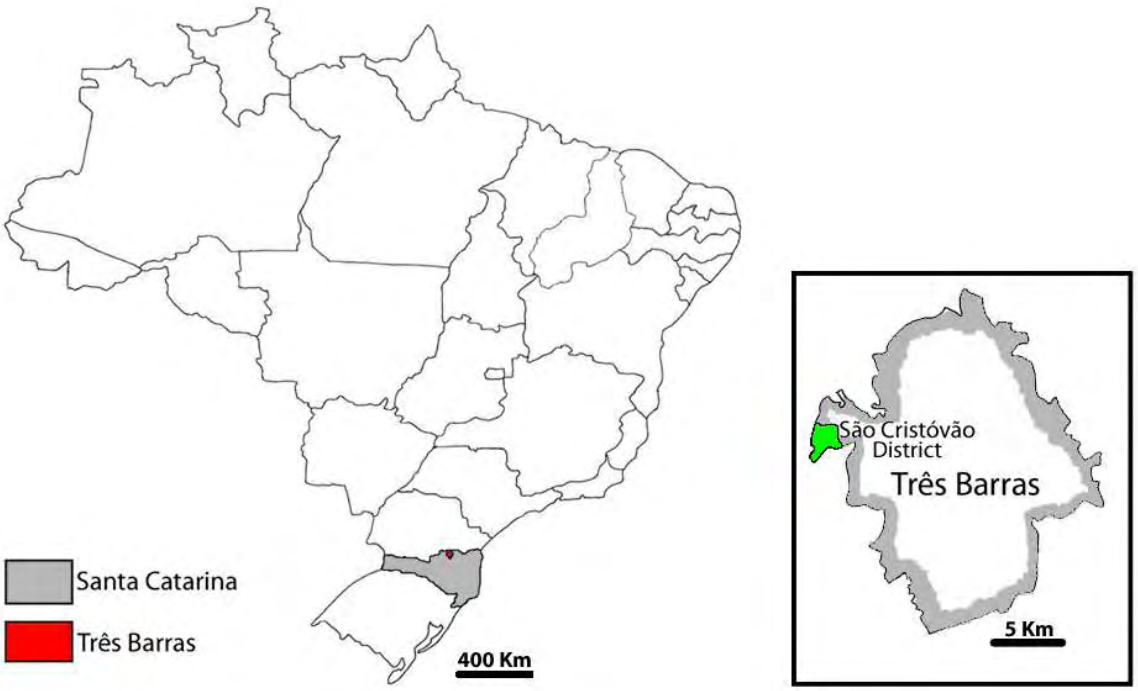



**Figura 5.1.** Localização geográfica do Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina, Brasil, 2009.

## 2.3. ANÁLISE DA URINA

Amostras de urina foram obtidas por cateterização vesical ou cistocentese guiada por ultrassom. A seguir, foram centrifugadas a 400 xg por cinco minutos, e o sedimento urinário resultante foi examinado entre lâmina e lamínula para a pesquisa de ovos de *D. renale*, por observação em microscópio óptico com aumento de 400x (SLOSS et al., 1999). O exame de urina foi considerado o padrão-ouro.

## 2.4. EMBRIONAMENTO DOS OVOS

A urina de cada animal positivo foi centrifugada por cinco minutos a 400 xg. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimento com os ovos do parasito foi

ressuspenso em 3 mL de água mineral, em placas de Petri, sendo mantido em estufa BOD com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 26 $^{o}$C (± 0,5 $^{o}$C) e umidade de aproximadamente 80% até o embrionamento ou por até 90 dias. A cada 2 a 3 dias, era efetuada, em microscópio óptico em aumento de 400x, a análise das placas, observando-se embrionamento, contaminação fúngica e bacteriana e viabilidade dos ovos. Foram considerados ovos férteis aqueles que desenvolveram larvas no interior e inférteis aqueles que não desenvolveram larvas nas mesmas condições.

## 2.5. ULTRASSONOGRAFIA

Foi realizada, com a contenção física dos animais, com Ultrassom Pie Medical modelo 100, com transdutor linear com frequência de 5,0 Mhz, com o objetivo de visualizar alterações nos órgãos abdominais (principalmente o rim) e estruturas do parasito (OLIVEIRA et al., 2005).

## 2.6. AMOSTRAS DE SORO

As coletas de sangue foram realizadas após a contenção física, por punção da veia cefálica ou jugular. O sangue foi acondicionado em tubo sem anticoagulante para obtenção do soro, que foi armazenado e congelado a -20$^{o}$ C em microtubos até o uso.

## 2.7. TESTE DE ELISA INDIRETO

O antígeno de *D. renale* utilizado no teste foi produzido a partir do esôfago de quatro helmintos adultos, um macho e três fêmeas, obtidos de cães naturalmente parasitados e que foram a óbito. Os esôfagos foram removidos e lavados por 5 vezes em PBS pH 7,2 com EDTA 1mM, fragmentados com lâmina de bisturi estéril e

macerados em placa de Petri com bastão de vidro. O material resultante foi submetido a sete ciclos de congelamento a -70ºC, por 5 minutos, e descongelamento em banho-maria a 37ºC e, a seguir, ao ultrassom (BRANSON Sonifier 250 - 20KHz, 1mA), utilizando 20 ciclos por minuto, efetuando séries de 10 segundos com intervalos de 10 segundos, por cinco minutos, em banho de gelo. O material resultante foi ultracentrifugado, por 30 minutos, a 12.000 xg a 4ºC, e o sobrenadante recuperado foi utilizado como antígeno solúvel. A quantidade proteica do antígeno solúvel foi determinada pelo método do ácido bicinconínico, utilizando-se o Kit de Reagentes BCA (Pierce Chemical Company®), de acordo com as recomendações do fabricante.

O protocolo do ELISA indireto utilizado para a detecção de lgG de cão anti-*D. renale* foi adaptado de MACHADO et al. (1997) e MINOZZO et al. (2004), conforme descrito no Capítulo IV. O antígeno foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6, na concentração de 5 μg/mL, e adicionados 100 μL dessa solução por poço da placa (Nunclon®, cat nº 167008), que foi incubada por 12 horas a 4ºC em câmara úmida. O excesso de antígeno foi removido por três lavagens com PBS pH 7,4 0,01M, contendo 0,05% Tween 80 (PBST). O bloqueio dos poços foi realizado com 200 μL de solução-tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6 com 6% de leite em pó desnatado, por 90 minutos, a 37ºC. O excesso de bloqueio foi removido por três lavagens com PBST. Os soros foram diluídos 1/100 em PBST com 6% de leite em pó desnatado, e adicionados 100 μL por poço. A placa foi incubada por 90 minutos, a 37º C, em estufa e depois lavada três vezes com PBST. O conjugado anti–IgG de cão peroxidase (SIGMA cat nº A6792) foi adicionado na placa, 100 μL por poço, diluído 1/7.000 em PBST com 5% de leite em pó desnatado. A placa foi incubada e lavada nas mesmas condições anteriores. A solução de substrato (tampão citrato pH 5,0 contendo 0,02% de peróxido de hidrogênio e 20 μg de OPD (SIGMA cat nº P6787)) foi adicionada na quantidade de 100 μL por poço da placa. A seguir, a placa foi mantida em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 minutos. A reação foi parada pela adição de 50 μL por poço de ácido sulfúrico a 2%, e os valores de absorbância foram obtidos no leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex

Technology) com filtro de 490 nm. O ponto de corte entre soros reagentes e não reagentes correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das absorbâncias dos soros de referência negativos.

Soros de cães naturalmente parasitados com presença de ovos do helminto na urinálise e/ou achado do parasito em necropsia foram usados como controles positivos. Como controle negativo, trabalhou-se com duas amostras de soro de cães de Jaboticabal, São Paulo, região não endêmica para *D. renale,* e com soros de cães provenientes de Três Barras, SC, negativos pelo método de sedimentação da urina para presença de ovos do *D. renale* e sem evidências de parasitismo por exame ultrassonográfico dos rins e cavidade abdominal.

## 2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A prevalência foi calculada conforme PEREIRA (2002) para os exames de urina, e para o método de ELISA indireto, foi corrigida de acordo com os níveis de sensibilidade e especificidade do método padronizado (PEREIRA, 2002), empregando-se a seguinte fórmula: **Prevalência corrigida = (Prevalência observada + Especificidade - 1)/(Sensibilidade + Especificidade - 1).**

Um inquérito com os proprietários dos cães foi realizado com o objetivo de avaliar fatores de risco para o parasitismo por *D. renale* na região, para verificar se a prevalência de fatores de risco no grupo de animais doentes era maior do que no grupo de animais sadios, pelo cálculo da razão de prevalências (RP), em que **RP= (a/a+b)/(c/c+d)** com intervalo de confiança de 95% e significância determinada pelo Qui-quadrado. A razão de prevalências é o equivalente ao risco relativo, que é calculado com base em dados de incidência (PEREIRA, 2002; THRUSFIELD, 2004). Cada uma das variáveis foi tratada como um fator de risco para a doença e considerada estatisticamente significante se $p \leq 0,05$, sugerindo haver correlação entre causa e efeito. Nas análises estatísticas que compararam sexo e idade, foi usado o teste não-

paramétrico do Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher (quando a frequência esperada em uma das células era menor que 5), obtido no programa estatístico EPI INFO 3.4.3.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 197 cães do Distrito que foram examinados, 28 (14,2%) apresentaram positividade para pesquisa de ovos do parasito na urina. Nessa mesma região, dado de 40 animais necropsiados, entre 2000 e 2003 foi de que 30% estavam parasitados pelo verme renal (PEDRASSANI e CAMARGO, 2004). Em 2004, outro estudo conduzido em parte desse Distrito, por exame do sedimento de urina de 30 cães, não detectou nenhum animal parasitado (CAMARGO et al., 2005). No presente estudo, com amostragem ampliada e obtida de diversas regiões do Distrito, realizada em outro período, o percentual de parasitismo detectado pelo exame de urina foi de 14,2%. Esse aspecto já foi indicado por MEASURES (2001), quando mencionou que, embora o *D. renale* esteja amplamente distribuído, ele ocorre somente em áreas enzoóticas localizadas, onde a prevalência entre os hospedeiros varia de ano para ano.

CHAMORRO e MORIENA (2003), na Argentina, também verificaram dados distintos de prevalência em anos diferentes. Ao pesquisarem ovos de *D. renale,* no sedimento urinário de cães de rua, encontraram 4,16% (1/24) dos casos positivos, em 2002, e todas as amostras negativas em 1985 (0/76).

Em Uruguaiana - RS, de 475 cães, entre errantes e domiciliados analisados, 1,68% foram positivos para *D. renale,* com ovos detectados na urina de 2% (6/300) dos domiciliados e parasitos em 1,14% dos 175 animais errantes necropsiados (COLPO et al., 2007).

Nos estudos de CHAMORRO e MORIENA (2003) e de COLPO et al. (2007), as prevalências de animais parasitados foram bem inferiores às observadas no Distrito São Cristóvão, sugerindo que as condições no local sejam favoráveis para a manutenção e disseminação desse nematódeo. Já SOUZA JÚNIOR e PÁDUA (1977), em 32 cães de rua de Taubaté - SP, observaram positividade em 28,1%, prevalência

superior à observada, porém realizada com uma amostra bem menor e há 32 anos, quando autores indicavam que o *D. renale* era considerado endêmico em cães (PACHECO et al., 1965). Na região de Botucatu – SP, de 50 cães necropsiados, 6 (12%) apresentaram o parasito (PACHECO et al., 1965).

A prevalência observada no presente estudo foi maior que as obtidas por NEVES et al. (1983), que observaram 5,3% de positividade em 244 animais, LEITE et al. (2005), com 0,56% de positivos em 1.960 animais, KOMMERS et al. (1999), com 0,49% de positivos em 3.259 cães, e COPPO e BREM (1983), com 2,9% de positivos em 102 cães de rua de duas cidades argentinas. Porém esses estudos foram conduzidos com dados obtidos de revisões de prontuários de necropsia.

Com relação ao sexo dos animais pesquisados, as fêmeas foram significativamente mais acometidas pelo *D. renale* que os machos, com percentuais de positividade de 28,2% e 10,7%, respectivamente ($\chi^2$= 7,81, p=0,0052). Considerando-se apenas os animais positivos, 60,7% eram fêmeas e 39,3% eram machos, indicando uma prevalência de positivos 2,62 vezes maior em cães fêmeas. Esse maior percentual de positividade nas fêmeas dessa região pode estar relacionado ao fato de permanecerem maior período de tempo nas residências, principalmente em períodos gestacionais que, nos casos avaliados, é onde se encontram os possíveis riscos de adquirir a infecção (fundos do terreno da casa é o rio ou córrego, são alimentadas com vísceras de peixe e têm possibilidade de contato com sapos). Outro fator a colaborar, pode ser a imunosupressão, ocasionada pelas gestações frequentes nestas fêmeas (Tabela 5.2).

COPPO e BREM (1983) destacaram que o *D. renale* pode afetar cães de diferentes idades e ambos os sexos. Esses autores observaram uma diferença no parasitismo entre gêneros, com maior acometimento em fêmeas, entretanto em apenas três animais (2 fêmeas e 1 macho).

MACE e ANDERSON (1975) verificaram que machos de *Mustela vison* eram significativamente mais parasitados que fêmeas, no entanto MECH e TRACY (2001) também observaram parasitismo maior nos machos, porém sem diferença significativa em relação às fêmeas. As hipóteses para essa diferença, sugeridas pelos autores, são

a maior extensão territorial do macho, deixando-o mais exposto a ingerir presas infectadas, e o seu maior consumo alimentar, favorecendo a ingestão de maiores quantidades de hospedeiros intermediários e paratênicos que as fêmeas. COLPO et al. (2007) também detectaram o parasito mais frequentemente em machos: de oito cães parasitados, seis eram machos e dois eram fêmeas. LEITE et al. (2005) verificaram que, de 11 cães adultos parasitados, quatro eram fêmeas e sete eram machos.

Com relação à idade, a positividade nos animais foi de 16,1% naqueles com até 1,5 anos; 11,8% nos com 1,6 até cinco anos; e de 19,1% nos com mais de cinco anos de idade, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as idades e a positividade para *D. renale* ($\chi^2$= 1,6281, ρ=0,4454). Também não houve diferença em relação ao grupo com até cinco anos e outro com mais de cinco anos ($\chi^2$= 1,23, ρ=0,2667) (Tabela 5.2). Os dados relativos à idade dos animais parasitados coincidem com os obtidos por MECH e TRACY (2001). Conforme HALLBERG (1953), as infecções naturais e experimentais sugerem que os hospedeiros são infectados somente uma vez. Assim, o fato de a prevalência ser similar nas diferentes idades pode indicar que os cães já sejam infectados quando muito jovens ou até filhotes, e que assim permanecem por longos períodos, conforme relataram VIEIRA NUNES et al. (2008), que um cão com apenas seis meses de idade possuía parasitos maduros. Se for considerado o período pré-patente desse parasito, a infecção deve ter ocorrido com um mês e meio de idade.

Dos 28 cães parasitados, em 22 foi determinada, por ultrassonografia, cirurgia ou necropsia, a localização do(s) parasito(s). Em 18 animais, a localização foi no rim direito, um apresentou apenas parasitismo na cavidade abdominal, e três animais possuíam parasito no rim direito e na cavidade abdominal. Nos seis cães nos quais não foi possível realizar a ultrassonografia, pela não colaboração do proprietário, havia eliminação de ovos do parasito na urina, sugerindo o parasitismo renal.

Em cinco cães (necropsiados ou submetidos à nefrectomia) os parasitos foram removidos e mensurados. Dois apresentaram parasitismo em rim direito, dois em rim direito e cavidade abdominal e, em um, o parasito estava na cavidade, porém esse animal apresentava uma lesão com ruptura de cápsula no rim direito, sugerindo que o parasito havia saído do rim e migrado para a cavidade (Tabela 5.1).

De 32 cães de rua que SOUZA JÚNIOR e PÁDUA (1977) necropsiaram, 28,1% estavam parasitados. Nesses animais, observaram 16 *D. renale* (8 machos e 8 fêmeas); desses, 9 no rim direito, 6 na cavidade peritoneal e 1 na região subcutânea próxima ao pênis. COLPO et al. (2007) detectaram em oito animais, o parasitismo em rim direito e cavidade abdominal.

De acordo com ANDERSON e GORDON (1982), os níveis de agregação dos parasitos tendem a apresentar variação inversamente proporcional à sua patogenicidade. Esse aspecto e uma possível imunidade duradoura podem ser fatores que contribuem para que a maioria dos cães observados com parasitismo pelo *D. renale* possuam infecções com pequeno número de parasitos.

MEHLHORN (2001) considera que a localização do *D. renale* na cavidade peritoneal em cães pode sugerir que esse não seja o hospedeiro definitivo natural do parasito. Entretanto, em *M. vison*, que são considerados os hospedeiros naturais do parasito (ANDERSON, 2000), a infecção também ocorre na cavidade peritoneal. Em estudo realizado por MECH e TRACY (2001) em *M. vison*, 54% dos animais abatidos possuíam cistos em rim direito com parasitos de ambos os sexos, e em 13,5% dos casos, havia parasitos na cavidade abdominal.

**Tabela 5.1.** Descritivo dos caninos parasitados e dos *Dioctophyme renale* removidos. Três Barras – SC, 2009.

| ***Nº*** | ***Raça*** | ***Idade (anos)*** | ***Sexo*** | ***Local afetado*** | **Parasitos** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | **Fêmeas** | **Machos** | **Total** |
| 1 | SRD | 4 | F | Rim direito | 2 (37cm, 47cm) | 1 (19cm) | |
| | | | | Cavidade abdominal | - | 1 (31cm) | 4 |
| 2 | SRD | 4 | F | Rim direito | 1 (32cm) | - | 1 |
| 3 | SRD | 9 | M | Rim direito | 1 (50cm) | - | 2 |
| | | | | Cavidade abdominal | - | 1 (35cm) | |
| 4 | SRD | 5 | F | Rim direito | 1 (49cm) | - | 1 |
| **5** | Doberman | 10 | M | Cavidade abdominal | - | 1 (17,5cm) | 1 |

Visons são considerados hospedeiros definitivos e reservatórios de *D. renale* na natureza, por causa da presença de grande número de parasitos de ambos os sexos e

por esses localizarem-se, geralmente, nos rins, o que favorece a liberação de ovos férteis para o meio ambiente (OSBORNE et al., 1969; BARRIGA, 1982).

Apesar de KOMMERS et al. (1999) indicarem que os cães, em razão do predomínio de parasitismo único, são hospedeiros definitivos anormais e terminais, uma vez que o ciclo de vida do parasito ficaria interrompido, em revisão de trabalhos (AMATO et al., 1976; KANO et al., 2003; MONTEIRO et al., 2002; PEREIRA et al., 2006; RAPPETI et al., 2008), na maioria dos casos, mais de um parasito por animal foi observado.

O cultivo dos ovos provenientes de urinas de 17 (60,7%) cães parasitados resultou em ovos com larvas de primeiro estádio (L1), o que indica um grande percentual de cães que eliminam ovos férteis do parasito, para o ambiente, na região estudada. Das urinas em que houve eliminação de ovos férteis, 12 eram de cães machos e cinco eram de cães fêmeas. Desse modo, embora exista na região um maior percentual de fêmeas parasitadas, foi nos cães machos que os parasitos obtiveram as melhores condições para parasitismo múltiplo, amadurecimento e posterior eliminação de ovos férteis de *D. renale* com a urina.

RIVERO et al. (2002) verificaram que a testosterona reduz a resistência do hospedeiro a infecções parasitárias, o que resulta em maiores prevalências e intensidades destas infecções nos machos da maioria das espécies de mamíferos.

As urinas de seis cães não apresentaram ovos férteis (3 cães machos e 3 fêmeas) e para outros cinco animais (3 cães fêmeas e 2 machos), não foi possível realizar o cultivo, por morte, fuga ou não aprovação do proprietário.

Em meio de cultivo, pela observação da fêmea do parasito que realizava postura, foi verificado que os ovos são liberados em grumos, e que a postura é diária (PEDRASSANI et al., 2008b). Esse fato justifica a observação, em alguns animais, de grandes quantidades de ovos, nos exames do sedimento urinário, em um dia de coleta feita, e de pequena quantidade de ovos em outros. Esse aspecto, de grande variação na eliminação de ovos faz com que o sistema de contagem do número de ovos não seja um bom indicativo do grau de parasitismo por *D. renale*.

A longevidade do *D. renale* e o período patente no hospedeiro definitivo são desconhecidos, entretanto Karmanova, em 1968, indicou que esse nematódeo pode sobreviver por três a cinco anos no hospedeiro definitivo (MEASURES, 2001) contaminando o ambiente durante esse período. Um animal, desde 2006, quando foi diagnosticado o parasitismo, tem sido acompanhado por exames de urina e permanece até o presente momento com eliminação de ovos do parasito.

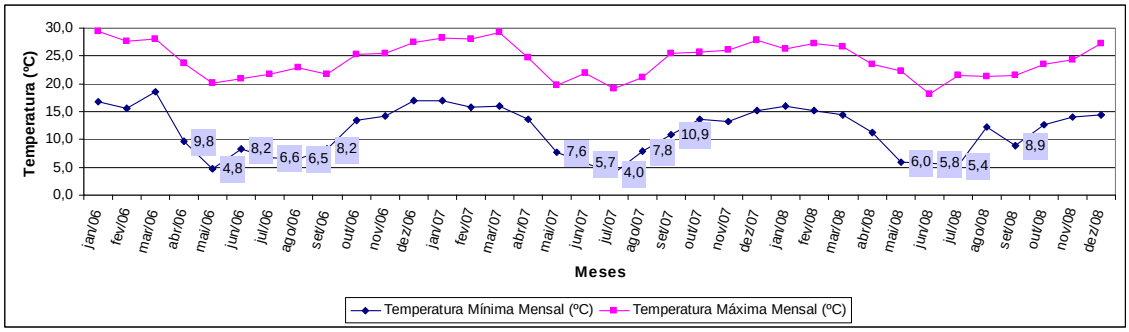
COPPO e BREM (1983) observaram que, de três cães parasitados, dois possuíam parasitos machos e fêmeas no rim, com eliminação de ovos férteis do parasito com a urina. Em Cachoeira do Itapemirim, Espírito Santo, em 2004, foram necropsiados 56 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses. Destes, 3,57% apresentaram *D. renale* no rim direito, e em 50% dos casos havia helmintos de ambos os sexos no mesmo rim (PEREIRA et al., 2006). Já VIEIRA NUNES et al. (2008), quando relataram dois casos em cães que foram submetidos à cirurgia, observaram que apenas em um havia parasitos machos e fêmeas no mesmo rim.

O embrionamento dos ovos de *D. renale* é dependente, além de um meio líquido, da temperatura do ambiente. A temperatura ótima está entre 25$^{o}$C e 30$^{o}$C, na qual em aproximadamente 30 dias, são observadas as larvas de primeiro estádio (L1) no interior dos ovos. Em baixas temperaturas, esse tempo pode ser de até sete meses (FREITAS, 1980). PEDRASSANI et al. (2009) verificaram 50% de ovos embrionados, em 18 dias após incubação, em temperatura de 26$^{o}$C. Divisão celular não foi observada em ovos mantidos em temperaturas de 6$^{o}$C a 10$^{o}$C, mas houve continuidade da evolução quando esta temperatura aumentou para 14$^{o}$C (MACE e ANDERSON, 1975).

Embora MEASURES (2001) considere que, na América do Sul, a transmissão do *D. renale* provavelmente ocorra ao longo do ano, na região Sul do Brasil, e especificamente no Distrito pesquisado, o clima subtropical é desfavorável, em algumas épocas do ano, à evolução desse nematódeo, principalmente no inverno. Na região estudada, nos períodos de final de outono e durante o inverno, nos anos de 2006, 2007 e 2008, a temperatura média esteve inferior a 10$^{o}$C, condição desfavorável ao desenvolvimento dos ovos. Nos demais períodos, as temperaturas médias permitiriam o

embrionamento dos ovos, porém o tempo poderia ser prolongado nas épocas com temperaturas mais amenas (Figura 5.2).

A distribuição espacial da dioctofimatose é uma função da interação entre fatores ambientais bióticos e abióticos. A concentração de animais domésticos (cães) e silvestres (peixes e sapos) em áreas restritas facilita o aumento da tensão ambiental de contaminação por ovos do helminto e larvas nos hospedeiros paratênicos, facilitando a infecção. Se as condições ambientais são adequadas ao desenvolvimento e à sobrevivência de formas pré-parasitárias nestes locais, fica facilitada a transmissão das infecções causadas por helmintos.




Fonte: dados coletados pela empresa RIGESA MeadWestvaco.

**Figura 5.2.** Temperaturas máximas e mínimas (média mensal) do período de janeiro de 2006 a dezembro de 2008, em Três Barras - SC. **Nota:** Temperaturas destacadas seriam desfavoráveis para o desenvolvimento de ovos de *Dioctophyme renale.*

Aspectos como tipo de alimentação fornecida ao animal, acesso a fontes de água e contato com hospedeiros paratênicos foram questionados aos proprietários dos cães analisados, pois não existem de dados sobre fatores de risco para dioctofimatose canina. A medida de associação obtida (razão de prevalências) permite estimar se a prevalência da doença é significativamente maior em animais expostos à suposta causa que naqueles não expostos (THRUSFIELD, 2004).

Todos os proprietários informaram que alimentam os animais com restos de alimentação humana, e desses, 6% informaram fornecer em alguns momentos também ração comercial. Quanto ao consumo de peixes do rio Canoinhas pelos proprietários, foi

observado que, naqueles que se alimentam com peixes do rio Canoinhas, a prevalência de dioctofimatose nos cães foi 2,46 (1,22<RP<4,97) vezes maior que naqueles animais cujos proprietários não possuem esse hábito alimentar (Tabela 5.2). Associado a esse fato, quando o animal era alimentado com peixes crus ou vísceras cruas de peixes, estes estavam 2,32 (1,18<RP<4,57) vezes mais parasitados por *D. renale* que os animais que não recebiam esse tipo de alimento (Tabela 5.2). COSTA et al. (2004) indicaram que uma característica de cães portadores deste helminto pode ser a pouca seletividade alimentar. Esse fato deve ter colaborado para a alta prevalência observada neste estudo, pois os cães são oriundos de um distrito de baixa renda do Município de Três Barras, SC.

O hábito de brincar com sapos e mordê-los, assim como ingeri-los, esteve significativamente mais presente nos cães parasitados pelo *D. renale.* Cães que apresentavam esses hábitos apresentaram uma prevalência 2,24 (1,13<RP<4,43) vezes maior do que aqueles sem esse hábito (Tabela 5.2). Como a região em questão é muito carente, os cães sofrem com a fome, e é frequente a observação de cães que vão às ruas, resgatam sapos recém-mortos por atropelamento e se alimentam de seus cadáveres. MACE e ANDERSON (1975), ao analisarem conteúdos de estômago de *M. vison*, encontraram fragmentos de sapos em 24% deles, indicando que esses hospedeiros paratênicos de *D. renale* fazem parte de sua dieta.

No Distrito de São Cristóvão, larva de *D. renale* já foi encontrada encistada na parede gástrica de *Chaunus ictericus*, indicando que essa espécie de sapo atua como hospedeiro paratênico e também como um indicador ambiental da presença desse nematódeo na região (PEDRASSANI et al., 2008c).

KOMMERS et al. (1999) observaram que 75% dos animais parasitados eram de rua. O parasitismo mais frequente em cães de rua, que têm hábitos alimentares pouco seletivos, foi observado também no Irã (ZAKARIAN e SHAFAII-TONKABONI, 1972). Pode-se supor, então, que esses animais tenham se infectado ingerindo diretamente o hospedeiro intermediário (oligochaeta) ou hospedeiros paratênicos, como peixes (ou suas vísceras) e rãs/sapos.

Os mustelídeos, principalmente os visons, normalmente alimentam-se de peixes e rãs, o que favorece a manutenção do ciclo do parasito. Outra possibilidade considerada, nos casos de parasitismo em visons, é que as larvas infectantes possam ser transmitidas ao longo da cadeia alimentar dos hospedeiros paratênicos e definitivos, visto que foram encontradas em peixes predadores que ingeriram peixes infectados (BARRIGA, 1982).

Os cães com hábito de revirar lixeiras não apresentaram maior prevalência de parasitismo, quando comparados aos animais sem esse hábito.

A visualização de anelídeos aquáticos no rio Canoinhas pelo proprietário, não resultou em maior percentual de cães parasitados. Isso pode ser justificado se no Brasil o oligochaeta que atua como hospedeiro intermediário, possuir tamanho similar ao de *L. variegatus* (4 a 10 cm de comprimento) e ficar sob o lodo do fundo do rio, o que dificulta a sua observação por pessoas.

Como o *D. renale* é um helminto com desenvolvimento em ambientes com água, necessária para o embrionamento dos ovos e para a permanência deles até a ingestão pelo hospedeiro intermediário, também aquático, o acesso de cães ao rio Canoinhas foi investigado. Maior prevalência de parasitismo esteve presente significativamente no grupo de animais que ingerem água do rio (3,13 vezes mais parasitados) ou de canais de vazão (2,97 vezes mais chance de parasitismo), quando comparado aos animais sem esses hábitos (Tabela 5.2). Porém, com relação ao fato de frequentar apenas as proximidades do rio em questão, não houve diferença significativa nas prevalências de parasitismo entre os grupos (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2.** Razão de prevalências para dioctofimatose entre um grupo de cães expostos ou não a fatores considerados de risco para o parasitismo (n=197). Três Barras – SC, 2009.

| **Fator predisponente** | ***D. renale* positivo (Caso)** | | ***D. renale* negativo (Controle)** | | **RP ($IC_{95\%}$)** | **Valor de *p*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **n** | **%** | **n** | **%** | | |
| Alimentação do proprietário com peixes do Rio Canoinhas | | | | | | |
| Sim | **17** | **60,7** | **59** | **35** | **2,46* (1,22-4,97)** | **0,0093** |
| Não | **11** | **39,3** | **110** | **65** | 0,41 (0,20-0,82) | |
| Total | **28** | | **169** | | | |
| Proprietário alimenta o cão com peixe cru ou vísceras cruas de peixe | | | | | | |
| Sim | **11** | **39,3** | **32** | **19** | **2,32* (1,18-4,57)** | **0,0157** |
| Não | **17** | **60,7** | **137** | **81** | 0,43 (0,22-0,85) | |
| Total | **28** | | **169** | | | |
| Cão revira lixo tendo acesso a restos de alimentação humana | | | | | | |
| Sim | 15 | 53,5 | 71 | 42 | 1,49 (0,75-2,96) | 0,2533 |
| Não | 13 | 46,5 | 98 | 58 | 0,67 (0,34-1,34) | |
| Total | 28 | | 169 | | | |
| Cão brinca, morde ou ingere sapos e rãs | | | | | | |
| Sim | **15** | **53,5** | **52** | **30,7** | **2,24* (1,13-4,43)** | **0,0183** |
| Não | **13** | **46,5** | **117** | **69,3** | 0,45 (0,23-0,88) | |
| Total | **28** | | **169** | | | |
| Cão frequenta as proximidades do rio Canoinhas | | | | | | |
| Sim | 21 | 75 | 98 | 58 | 1,97 (0,88-4,40) | 0,0882 |
| Não | 07 | 25 | 71 | 42 | 0,51(0,23-1,14) | |
| Total | 28 | | 169 | | | |
| Cão ingere água no Rio Canoinhas | | | | | | |
| Sim | **18** | **64** | **54** | **32** | **3,13* (1,53-6,40)** | **0,0009** |
| Não | **10** | **36** | **115** | **68** | 0,32 (0,16-0,66) | |
| Total | **28** | | **169** | | | |
| Cão ingere água dos canais de vazão do Rio Canoinhas | | | | | | |
| Sim | **20** | **71,4** | **70** | **41,4** | **2,97* (1,38-6,42)** | **0,0031** |
| Não | **08** | **28,6** | **99** | **58,6** | 0,34 (0,16-0,73) | |
| Total | **28** | | **169** | | | |
| Proprietário já observou anelídeos no rio Canoinhas | | | | | | |
| Sim | 10 | 36 | 63 | 37,2 | 0,94 (0,46-1,93) | 0,8739 |
| Não | 18 | 64 | 106 | 62,8 | 1,06(0,52-2,17) | |
| Total | 28 | | 169 | | | |
| Idade do cão | | | | | | |
| Até 5 anos | 19 | 67,8 | 131 | 77,5 | 0,66 (0,32-1,36) | 0,2667 |
| Acima de 5 anos | 9 | 32,2 | 38 | 22,5 | 1,51 (0,73-3,11) | |
| Total | 28 | | 169 | | | |
| Sexo do cão | | | | | | |
| Macho | 17 | 60,7 | 141 | 83 | 0,38 (0,19-0,75) | **0,0052** |
| Fêmea | 11 | 39,3 | 28 | 17 | **2,62* (1,34-5,14)** | |
| Total | 28 | | 169 | | | |

RP= Razão de Prevalências; IC= Intervalo de Confiança; * Significativo, com 5% de probabilidade.

Diversos autores (ALVARENGA et al., 1984; KANO et al., 2003; PEREIRA et al., 2006) relataram o acesso de animais parasitados a ambientes aquáticos, justificando sua importância na transmissão do *D. renale*. Os cães aqui relatados habitam as margens de um rio que se estende por grande parte do Distrito. Esse rio é importante para a região, nele são desenvolvidas atividades de lazer, captação de água e extrativismo de peixes. Além disso, na região existem muitos canais para escoamento das águas desse rio, para evitar inundações (Figura 5.2). Esse fato torna-se importante, não apenas pelo parasitismo em cães mas também pelo fato de ser uma zoonose (ACHA e ZYFRES, 1986; IGNJATOVIC et al., 2003) e que pode estar acometendo a população do Distrito. Assim, a verificação dessa alta prevalência em cães indica a necessidade de estudos relativos à prevalência em humanos.

Para KANO et al. (2003), os animais infectados pelo parasito podem ser utilizados como sentinelas para a população humana, já que essa se encontra exposta aos mesmos fatores de risco que os animais.

No Distrito que é delimitado pelo curso do rio Canoinhas, houve uma maior detecção de animais com parasitismo pelo *D. renale* na parte baixa desse rio, onde esta localizada a maior proporção de canais de vazão, bem como as residências estão localizadas mais próximas às suas margens (Figura 5.3).

Os dados confirmaram que, no Distrito estudado, há uma concordância entre os fatores indicados como predisponentes para essa doença e a maior prevalência de parasitismo nos cães expostos a esses fatores, bem como colaboram com o fato do achado de larvas de *D. renale* em sapos do Distrito de São Cristóvão.

Os testes imunológicos não são largamente utilizados no diagnóstico das infecções por helmintos, pois é geralmente mais fácil chegar a um diagnóstico, examinando as fezes ou a urina quanto à presença de ovos do parasito. Entretanto existem algumas doenças helmínticas, como, por exemplo, a dirofilariose e a triquinose, nas quais os ovos não são eliminados e o diagnóstico sorológico torna-se quase essencial. Nesses casos, os testes de ELISA correspondem às técnicas diagnósticas mais úteis (TIZARD, 1998). Na dioctofimatose canina, os animais parasitados são essencialmente diagnosticados pela necropsia ou pela demonstração direta de ovos na

urina. Entretanto, ovos são detectados na urina dos cães com parasitismo renal, não estando presentes na urina de animais com parasitismo em outras localizações nem naqueles com parasito de apenas um sexo ou ainda imaturos.

Por isso, o método de ELISA indireto foi utilizado como uma alternativa para diagnosticar o parasitismo nesses animais pela detecção de anticorpos específicos no soro. Quando os animais testados pelo exame urinário foram testados também pelo ELISA indireta, apenas três animais, dentre os positivos pelo exame do sedimento de urina (n=28), não se apresentaram positivos. Dos soros testados pelo ELISA indireto padronizado, 40 foram reagentes ao antígeno de *D. renale.* Destes, 15 não apresentaram ovos do parasito na urina (Apêndice 1).

Essa sorologia positiva pode ser devido a animais com parasitos machos ou imaturos ou, ainda, com parasitismo extrarrenal e que foram detectados pelo antígeno produzido do esôfago de *D. renale*.

Pela pesquisa de anticorpos IgG anti-*D. renale*, pelo teste ELISA padronizado, a prevalência de dioctofimatose canina foi de 20,3%. Entretanto a prevalência de resultados positivos obtidos por um teste diagnóstico, em uma determinada população, não é sinônimo de prevalência da doença nessa população. Isso só seria verdade com a utilização de um teste com sensibilidade e especificidade de 100% (PEREIRA, 2002). Portanto, corrigindo a prevalência observada pelo teste ELISA indireto, de acordo com os níveis de sensibilidade e especificidade do método padronizado (S=92,3%, E=93,8%, conforme descrito no capítulo IV), ficou definida em 16,4%; valor este bastante próximo ao de 14,2% obtido pela pesquisa de ovos do parasito na urina. Esse dado indica a concordância de resultados entre o método de rotina e o ELISA teste padronizado e também a aplicabilidade dessa técnica em estudos epidemiológicos.

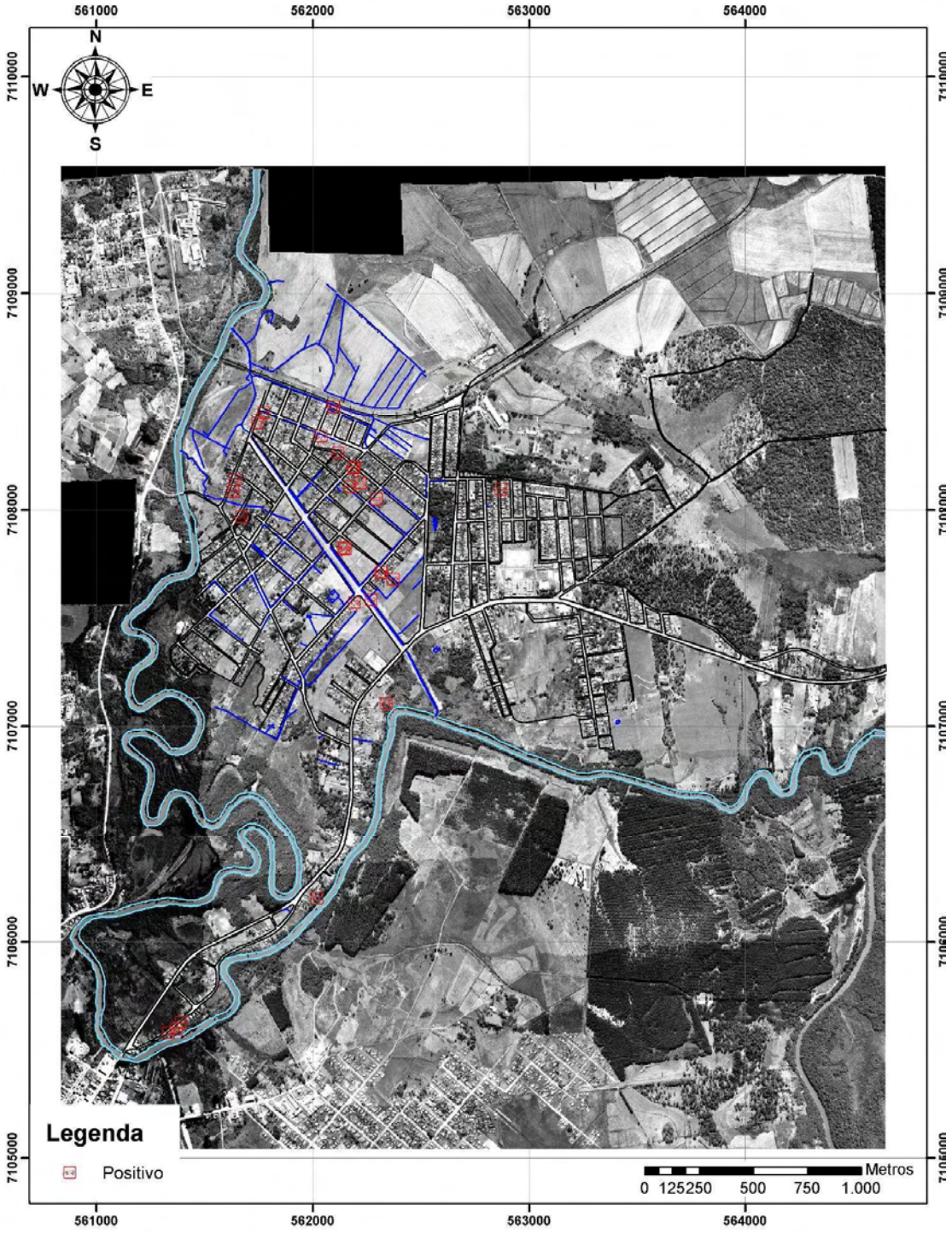



**Figura 5.3.** Locais de observação de cães parasitados no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina, Brasil.

## 4. CONCLUSÕES

Como a dioctofimatose canina é uma afecção considerada rara em cães, a prevalência dessa doença na região é alta. O parasitismo independe da idade do animal, entretanto foi mais frequente nas fêmeas.

O potencial hídrico e de hospedeiros paratênicos da região estudada foram fatores que contribuíram para a ocorrência do parasitismo.

Os cães parasitados estão contribuindo para a contaminação do ambiente com formas infectantes do *D. renale.*

Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas de dioctofimatose canina podem demonstrar que um considerável percentual de cães apresenta evidências de infecção por *D. renale* por meio de reações sorológicas positivas, sem, entretanto, apresentar manifestações clínicas da doença ou eliminação de ovos do parasito na urina.

Os dados demonstram que o método de ELISA indireto pode ser usado para detecção de anticorpos específicos contra *D. renale* no soro de cães suspeitos ou em estudos epidemiológicos.

# CAPÍTULO VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS

## 1. CONCLUSÕES

A temperatura de incubação interferiu no tempo de desenvolvimento dos ovos de *D. renale*, com tempo médio de incubação inversamente proporcional à temperatura de incubação. As larvas não eclodiram e apresentaram motilidade por aproximadamente uma semana após sua formação.

Larvas do parasito foram encontradas em cistos na parede gástrica de *C. ictericus* e uma dessas foi capaz de chegar à fase adulta no rim direito, em um cão experimentalmente infectado. Trata-se do primeiro relato de larva infectante desse parasito em hospedeiro paratênico no Brasil. Estas larvas foram imunomarcadas em tecido de hospedeiro paratênico naturalmente infectado, pelos métodos de IHQ e RIFIT, quando submetidas aos soros de camundongos imunizados com antígeno produzido do esôfago de formas adultas de *D. renale*.

O antígeno do esôfago desse nematódeo, que foi usado nas técnicas de ELISA indireta e WB. A técnica de ELISA indireta padronizada apresentou sensibilidade de 92,3% e 93,8% de especificidade, com Kappa de 0,76. A técnica de WB demonstrou existirem componentes antigênicos e imunogênicos no antígeno produzido. Os camundongos imunizados com este antígeno e cães naturalmente parasitados apresentaram evidenciação de algumas bandas similares pelo WB.

Em Três Barras-SC, 14,2% dos cães examinados, apresentaram ovos do parasito na urina e 16,4% apresentaram anticorpos anti-*D. renale* no soro. O parasitismo foi mais freqüente nas fêmeas, sem interferência da idade do animal.

Na região o potencial hídrico e de hospedeiros paratênicos foram fatores que contribuíram para a ocorrência do parasitismo, bem como, os cães parasitados estão contribuindo para a contaminação do ambiente com ovos do parasito.

## 2. PERSPECTIVAS

Fatores como diferentes pH e salinidade da água, devem ser avaliados, verificando sua influência no embrionamento dos ovos.

Novas populações de peixes devem ser avaliadas para verificar a sua importância como hospedeiro paratênico desse parasito.

O estudo epidemiológico demonstrou que um percentual de cães apresenta evidências de infecção por *D. renale* por meio de reações sorológicas positivas, sem, apresentar manifestações clínicas da doença ou eliminação de ovos do parasito na urina. Como, camundongos imunizados com o antígeno de *D. renale,* cães naturalmente parasitados e cães positivos na sorologia pelo ELISA indireto padronizado apresentaram evidenciação de algumas bandas similares pelo WB, estas bandas podem ser isoladas e analisadas contra soro com anticorpos específicos para melhor avaliação de sua reatividade e interesse diagnóstico.

Após definição das bandas mais importantes, estas podem ser testadas como antígenos vacinais.

**REFERÊNCIAS**


ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Dioctofimosis. *In:* ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales.** 2. ed. Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C., p. 806 - 809, 1986.

ALVARENGA, J.; MATERA, J. M.; BARROS, P. S. M.; RANDI, R. E.; STERMAN, F. *Dioctophyma renale* in a dog. **Modern Veterinary Practice,** Califórnia, v. 65, n. 2, p. 125, 1984.

AMATO, J. F. R; GRISI, L.; ROSA, V. L. M, - Reunião dos casos brasileiros de Dioctofimose canina, com o registro de mais alta intensidade de infecção por *Dioctophyma renale* (GOEZE, 1782). **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v. 36, n.1, p. 117-122, 1976.

ANDERSON, H. M. Giant kidney worm infection in a dog. **Modern Veterinary Practice**, Califórnia, v. 67, n. 2, p. 153-154, 1986.

ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. 2 ed. CABI Publishing, Oxon, UK. 2000, 650p.

ANDERSON, R. C., BAIN, O. Keys to genera of the superfamilies Rhabditoidea, Dioctophymatoidea, Trichinelloidea and Muspiceoidea. ***In:*** **CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates.** n. 9, ANDERSON, R. C.; CHABAUD, A. G.; WILLMOTT, S. (eds.). Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Buckinghamshire, U.K., p. 1–26. 1982.

ANDERSON, R. C.; GORDON, D. M. Processes influencing the distribution of parasite number within host population with special emphasis on parasite-induced host mortalities. **Parasitology**, Londres, v.85, p. 373-398, 1982.

APREA, A.; VILLANUEVA, M.; ACOSTA, W.; ZAPATA, G.; GOMEZ, F.; DIESSLER, M.; BONZO, E.; VENTURINI, L. Um caso de neumotórax por ubicación errática de *Dioctophyma renale*. XIX Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, **Anais...** Buenos Aires, Argentina, 2004.

AUGUSTO FILHO, O.; ARAÚJO, W.N.; PAES, A.C.; MAMPRIM, M.J. Dioctofimíase canina bilateral com vários parasitas – Relato de caso. *In:* SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, XI. 1999, Salvador, **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999, p.175.

AVMA. American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). [Acesso em 09/2007]. Disponível em: <http://www.avma.org/ resources/euthanasia.pdf>.

BARRIGA, O. O. Dioctophymosis. *In*: SCHULTZ, M. G. CRC **Handbook series in zoonoses**. Flórida, p. 83-92, 1982.

BARROS, D. M.; LORINI, M. L.; PERSSON, V. G. Dioctophymosis in the little grison (*Galictis cuja*). **Journal of Wildlife Diseases**, California, v. 26, n. 4, p. 538-539, 1990.

BARROS, G. C. *Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782) em cão no estado do Espírito Santo. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 23, p. 195-196, 1971.

BOWMAN, D. D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8 ed. São Paulo: Manole. p. 224, 2006.

BRAILE, D. M.: GODOY, M. F. **Programa para Cálculos Estatísticos e Testes Diagnósticos for Windows v.1.8** [acesso em 03/2009]. Disponível em: http://www.braile.com.br/cientifica/pesqcien.htm#braile.

BRANGEL JR, J. J.; OLIVEIRA, R. T.; JOBIM, G. O.; FERNANDES, R. E. *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) em um cão. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.4-5, p.103-108, 1976-7.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da Bacia de São Francisco)**. Brasília: CODEVASF, 2 ed., 1984. 115p.

BROWN, S. A.; PRESTWOOD, A. K. Parasitas do trato urinário. ***In*: KIRK, R. W. Atualização terapêutica veterinária de pequenos animais.** São Paulo: Manole, v 2, p. 1455-1457, 1988.

BRUN, M.V.; BECK, C.A.C.; MARIANO, M.B.; ANTUNES, R.; PIGATTO, J.A.T. Nefrectomia laparoscópica em cão parasitado por *Dioctophyma renal* – Relato de caso. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v.5, n.1, p.145-152, 2002.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ , J. M.; SHOSTAK, A. W.. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis *et al*. Revisited**. Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 40, p. 575-583, 1997.

CAMARGO, F. R.; SCHIMIDT, E. M. S.; PEDRASSANI-RECH, D. Dioctofimose em cães do distrito de São Cristóvão: rio com peixes parasitados = cães com problemas renais? **Iniciação: revista de divulgação científica da Universidade do Contestado (SC) UnC,** Caçador, v. 14, n.1, p. 65-75, 2005.

CARNEIRO, L. A.; ALVES, M. M.; SOARES, M. C. P. *Dioctophyma renale* no *Speothos venaticus* (Cachorro-do-mato-vinagre). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** Uberaba, n. 41, suplemento 1, p. 136, 2008.

CHAMORRO, V.; MORIENA, R. A. **Diagnóstico e incidencia de la dioctophymosis en la Ciudad de Corrientes, Argentina**. Trabajo Final de Graduación realizado en la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE, Corrientes, Argentina, 2003. [Acesso em 07/2008]. Disponível em http://www.portalveterinaria.com/article175.html.

COLPO, C. B.; SILVA, A. S. da; MONTEIRO, S. G.; STAINKI, D. R.; CAMARGO, D. G.; COLPO, E. T. B. Ocorrência de *Dioctophyma renale* em cães no Município de Uruguaiana – RS. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia,** Uruguaiana, v. 14, n. 2, p. 175-180, 2007.

COPPO, A. J.; BREM, J. J. Canine Dioctophymosis in the north east of Argentine. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 259-262, 1983.

CORRÊA, O. **Doenças parasitárias dos animais domésticos**. 2 ed. Porto Alegre: Sulina. 1973. p. 210 – 217.

COSTA, H. M; FREITAS, M. G. Alguns helmintos parasitos de Guará, com descrição de *Molineus brachiurus* N.S.P. (Nematoda-trichostringylidae). **Arquivo Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, n. 19, p. 25-29, 1967.

COSTA, H. M. A.; LIMA, W. S.. *Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782): ocorrências em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.40, p. 243-245, 1988.

COSTA, P. R. S.; ARGOLO NETO, N. M.; OLIVEIRA, D. M. C.; VASCONCELLOS, R. S.; MENEZES, F. M. Dioctofimose e leptospirose em um cão – relato de caso. **Revista Clínica Veterinária.** São Paulo, n. 51, p. 48-50, 2004.

COYNER, D. F.; SPALDING, M. G.; FORRESTER, D. J. Epizootiology of *Eustrongylides ignotus* in Florida: transmission and development of larva in intermediate hosts. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 2, p. 290-298, 2003.

COYNER, D. F.; SPALDING, M. G.; FORRESTER, D. J. Influences of salinity and desiccation on development of first-stage larvae in the egg of *Eustrongylides ignotus* and their impact on the Epizootioligy of *Eustrongylides ignotus* in Florida, USA. **Comparative Parasitology**, Nebraska, v. 71, n. 2, p. 262-263, 2004.

CUQUERELLA, M.; GÓMEZ-MUÑHOZ, M. T.; CARRERA, L.; FUENTE, C.; ALUNDA, J. M. Cross antigenicity among ovine trichostrongyloidea. Preliminary report. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v.53, p.243-251, 1994.

DACORSO FILHO, P.; LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, J. Sobre a infestação e lesões anatomo patológicas produzidas por *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) em cães. **Revista Veterinária,** Rio de Janeiro, v.8, n.2, p.35-54, 1954.

DAVENPORT, H. E. The haemoglobins of *Nippostrongylus muris* (Yokagawa) and *Strongylus* spp. **Biological Sciences**, Londres. v. 136, n. 883, p. 271-280, 1949.

DREWES, C. D.; BRINKHURST R. O. Giant fibers and rapid escape reflexes in newly hatched aquatic oligochaetes, *Lumbriculus variegatus* (Family Lumbriculida*).* **Invertebrate reproduction and development,** Halle, v. 17, p. 91-95, 1990.

DYER, N. W. *Dioctophyma renale* in ranch mink. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** Davis, v. 10, p. 111-113, 1998.

FERREIRA NETO, J. M.; BERNIS, W. O.; NUNES, L. P.; PIPPI, N. Observações sobre o comportamento do *Dioctophyma renale* transplantado para a cavidade abdominal do cão. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, v.24, p. 217-219, 1972.

FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S.; SANTOS, G. M. **Peixes comerciais do Médio Amazonas: região de Santarém, Pará**. Brasília: Edições IBAMA, 1998. 214p.

FORRESTER; S.D.; LEES, G. E.. Nefropatias e uropatias. *In*: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders – Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, p. 902 - 925, 1998.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4 ed. São Paulo: Ícone. p. 370 – 372, 2004.

FOSSATI, L. C.; KOEHLER, J. H.; CAVALET, E.; MATOS, J. P.. Florística e fitossociologia da floresta ripária do Rio Canoinhas, da foz ao Rio Bonito. *In*: **X Seminário de Desenvolvimento da Pesquisa na Universidade do Contestado**: Curitibanos: UnC, 2006, Cd-rom.

FREIRE, N. M. S. Ocorrência de *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) parasitando *Canis familiaris* L. em Belém do Pará. **Atas Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 31-32, 1979.

FREIRE, S. E.; FEDOZZI, F.; FREIRE, A. F.; MONTEIRO JÚNIOR, L. A.; NAVARRO, S.. *Dioctophyme renale* em cão: relato de caso. *In:* III ENCONTRO DE PRODUÇÃO ACADÊMICA MEDICINA VETERINÁRIA FEOB. 2002, São João da Boa Vista, **Anais...** São João da Boa Vista: FEOB, 2002, p. 174 - 177.

FREITAS, M. G. **Helmintologia Veterinária.** 4 ed. Belo Horizonte: Rabelo, p. 267–270, 1980.

FROST, D. R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J. N.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C.; SÁ, R. O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S. C.; RAXWORTHY, C. J.; CAMPBELL, J. A.; BLOTTO, B. L.; MOLER, P.; DREWES, R. C.; NUSSBAUM, R. A.; LYNCH, J. D.; GREEN, D. M.; WHEELER, W. C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**., New York, n. 297, p. 1 – 370, 2006.

FUNPAR - FUNDAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PARA O DESENVOLVIMENTO DA CIÊNCIA, DA TECNOLOGIA E DA CULTURA. Relatório Final - **Diagnóstico e monitoramento da cobertura vegetal da área de influência direta e indireta do vazamento de óleo da Refinaria Presidente Getúlio Vargas** - REPAR, Araucária/PR, Fase II - Diagnóstico, Curitiba/PR, Jan/2002, 63p.

FURUTA, P. I. Infecção experimental per oral de cães com ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) infectados com taquizoítas de *Neospora caninum,* 2008, 69f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária – área de concentração Patologia Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

GALVÃO, G. R.; PERALTA, A. S. L.; MOREIRA, L. F. M.; COSTA, E. M. F.; SANCHES, O. C.; MATOS, E. Relato de um caso de Dioctofimose em cão da Região Metropolitana de Belém, Estado do Pará. *In:* XI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1999, Salvador, **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999, p. 174.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K.. **Manual de hematologia veterinária**. 2 ed. São Paulo: Varela, p. 26-38, 2005.

GARGILI, A; FIRAT, I.; TOPARLAK, M.; ÇETINKAYA, H. First Case Report of *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) in a dog in Istanbul, Turkey. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. Turquia, v. 26, p. 1189-1191, 2002.

GENNARI, S. M.; TAIT, A. An attempt to vaccinate sheep with whole homogenate of third-stage and adult *Haemonchus contortus.* **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p.131-135, 1992.

GRECHI, R. Parasitismo por *Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782) em "preguiça",*Choloepus didactylus* LINNAEUS, 1785. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica**. São Paulo, v.3, p.325-334, 1965.

GUIMARÃES, M. C; COUTINHO, S. G.; ANTUNES, C. M. F. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p.55-58, 1987.

GUTIERREZ, Y.; COHEN, M.; MACHICAO, C. N. *Dioctophyme* larva in the subcutaneous tissues of a woman in Ohio. **American Journal of Surgical Pathology**, Cleveland, v. 3, p. 800–802, 1989.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.

HALLBERG, C. W. *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) a study of the migration routes to the kidneys of mammals and resultant pathology. **Transactions of the American Microscopical Society**, New York, v. 72, n. 4, p. 351-363, 1953.

HANJAN; F.A.; SADIGHAN, A; MIKAKHFAR, B., ARFAA, F. The first report of human infection with *Dioctophyma renale* in Iran. **Transcriptions of royal society of tropical medicine and Hygiene,** London , v.62,p.647-648., 1968.

HSU, S., PLAUTZ, G. E., KRAUSS, J. C., CHANG, A. E. Tumor immunology. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 278, n.22, p.1972-1981, 1997.

IGNJATOVIC, I.; STOJKOVIC, I.; KUTLESIC, C.; TASIC, S. Infestation of the human kidney with *Dioctophyma renale.* **Urologia Internationalis**, Suíça, v. 70, n. 1, p. 70-73, 2003.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Infra-estrutura do município de Três Barras – SC**. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. 2000. Acesso em 11/07]. Disponível em: http://www.cnm.org.br/infra/mu_infra_esgotamento.asp?iIdMun=100142271.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira.** (Manuais Técnicos de Geociências nº. 1). Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – DERNA, 1992. 92p.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **População residente** – Três Barras [Dados da internet]. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. [Acesso em 03/2007]. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/contagem_final/tabela1_1_22.pdf ..

International Commission on Zoological Nomenclature. Opinion 1552. **Bulletin of Zoological Nomenclature**, Londres, v.46, p. 199–200, 1989.

KANO, F. S.; SHIMADA, M. T.; SUZUKI, S. N.; OSAKI, S. C.; MENARIM, B. C.; RUTHES, F. R. V.; LAIDANE FILHO, M. A.. Ocorrência da dioctofimose em dois cães no município de Guarapuava – PR. v. 24, n. 1, p. 177-180. **Semina**: Ciências Agrárias, Londrina, 2003.

KOMMERS, G. D.; ILHA, M. R. S.; BARROS, C. S. L.. Dioctofimose em case: 16 casos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.517-522, 1999.

LAEMMLI, U. K. Clevage of structural proteins using assembly of head bacteriophage T4. **Nature**, Canadá, v. 227, p.680-685, 1970.

LEITÃO, J. S. **Parasitologia veterinária**. Volume II. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1983. p. 534 – 535.

LEITE, L. C.; CÍRIO, S. M.; DINIZ, J. M. F.; LUZ, E.; NAVARRO-SILVA, M. A.; SILVA, A. W. C.; LEITE, S. C.; ZADOROSNEI, A. C.; MUSIAT, K. C.; VERONESI, E. M.; PEREIRA, C. C. Anatomopathologic lesions found in *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) infections in domestic dogs (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758). **Archives of Veterinary Science,** Curitiba, v. 10, n. 1, p. 95-101, 2005.

LEVINE, N. D. **Tratado de parasitologia veterinária**. Espanha: Acribia. 1978. p. 147.

LIMA, S. R. S.. Capital transnacional na indústria da madeira em Três Barras: as *company tows* e a produção do espaço urbano. 2007, 96f, **Dissertação** (Mestrado em Geografia). Universidade Federal do Paraná, Curittiba, PR. [Acesso em 11/2007]. Disponível em: http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/10356/1/trabalho.pdf.

LOW, D. G. Parasites of the upper and lower urinary tract of the dogs and cats. *In*: **OSBORNE, C.A., FINCO, D.R. Canine and feline nephrology and urology.** Baltimore: William & Wilkins, 1995. p. 917-921.

MACE, T. F., ANDERSON, R. C. Development of the giant kidney worm, *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Dioctophymatoidea). Departament of Zoology. **Canadian Journal of Zoology,** Canadá. v. 53, 1975.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E.G.; MACHADO, M. R.; VALADÃO, I. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p.17-26, 1997.

MARQUES, A. C. **Planejamento da paisagem da Floresta Nacional de Três Barras (Três Barras – SC): subsídios ao plano de manejo.** 2007. f.65-66. Dissertação (Mestrado em Geografia). Programa de Pós-Graduação em Geografia, UFPR, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARQUES, A. P.; RAFFI, L. L.; RAFFI, M. B.; LOPES, D. C.; SOUZA, R. B.; RAPOSO, J. B. *Dioctophyma renale* em caninos no município de Pelotas-R.S - relato de caso. In: IX ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 1999, Belo Horizonte, **Resumos...**Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1999, p. 61.

MATTOS JÚNIOR, D. G.; PINHEIRO, J.. *Dioctophyma renale* (GOEZE, 1782) no tecido subcutâneo da região inguinal de um cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.46, n.2, p. 301-302, 1994.

MEASURES, L. N. The development of *Eustrongylides tubifex* (Nematoda: Dioctophymatoidea) in oligochaetes. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 74, n. 2, p. 294-304, 1988

MEASURES, L. N. Dioctophymatosis. *In:* **SAMUEL, W.M.; PYBUS, M.J.; KOCAN, A.A. Parasitic Diseases of Wild Mammals.** 2 ed. Iowa State University Press: USA, 2001.

MEASURES, L. N.; ANDERSON, R. C.. Centrarchid fish as paratenic hosts of the giant kidney worm, *Dioctophyma renale* (GOEZE, 1782), in Ontario, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v.21, n.1, p.11-19, 1985.

MECH, L. D., TRACY, S. P. Prevalence of giant kdney worm (*Dioctophyma renale*) in wild mink (*Mustela vison*) in Minnesota. **Américan Midland Naturalist,** Notre Dame, v.145, n.1, p.206-209, 2001.

MEHLHORN, H., **Encyclopedic reference of parasitology: diseases, treatment, therapy.** 2 ed. Springer: Berlin, Alemanha, 2001. 678p.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca. 1995. p. 11 – 22; 63 – 72.

MIGLIANO, M. F.; MATERA, E. A. Dioctofimose em *Canis familiaris*, estudo clínico médico e cirúrgico de um caso. **Revista de Medicina Veterinária**, São Paulo, v.2, n.2, p. 81-93, 1966.

MINOZZO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLORTEGUI, C. C., SOARES, V. E.; COSTA, A. J. Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra-*Cysticercus bovis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.857-864, 2004.

MIRANDA, M. A.; BENIGNO, R. N. M.; GALVÃO, G. R., OLIVEIRA, S. A. L. *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782): localização ectópica e alta intensidade parasitária em *Canis familiaris* do Pará–Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.44, n.2, p.151-153, 1992.

MOMO, C.; DUNE, A. C. C.; BECHARA, G. H. Dioctofimose em cavidade abdominal de felino doméstico - relato de caso. ***In:*** XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e do XI Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul. **Anais...** Curitiba-PR, 2008. CD - Rom.

MONTEIRO, A. C. Eustrongilose do cão. **Boletim Veterinário do Exército 1**, n.8, p.191-193, 1934.

MONTEIRO, L. L.; PINTO, P. S. A.; SALCEDO, J. H. P., ARAÚJO, J. V.; SANTOS, W. L. M.; CECON, P. R. Antígenos de larva de *Taenia solium* em ELISA para diagnóstico da cisticercose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v.59, n.1, p.21-25, 2007.

MONTEIRO, S. G.; SALLIS, E. S. V.; STAINKI, D. R. Infecção natural por trinta e quatro helmintos da espécie *Dioctophyma renale* (Goeze,1782) em um cão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana,** Uruguaiana, v.9. n.1. p.29-32. 2002.

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

NEVES, D. S.; MORAIS, A. N.; NOGUEIRA, R. H. G.; CHQUILOFF, M. A. G. Ocorrência de *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) em cães da região de Lages, Estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.35, n.5, p. 665-673, 1983.

OLIVEIRA, L. L.; ATTALLAH, F. A.; SANTOS, C. L.; WAKOFS, T. N.; RODRIGUES, M. C. D.; SANTOS, A. E.. O uso da ultrassonografia para o diagnóstico de *Dioctophyma renale* em cão – relato de caso. **Revista Universidade Rural**, Seropédica, v.25, suplemento, p. 323-324, 2005.

ORIHEL, T. C., ASH, L. R. **Parasites in human tissues.** American Society of Clinical Pathologists, Chicago, Illinois. 1995. 386 p.

OSBORNE, C. A.; STEVENES, J. B.; HANLON, G. F.; ROSIN, E.;BEMRICK, W. J. *Dioctophyma renale* in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Washington, v. 155, n. 4, p. 605-620, 1969.

PACHECO, A. C.; CIRNE, B. R.; CORREIA, W. M. Dioctofimíase em cães na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo,** São Paulo, v. 32, n. 1, p. 1-6, 1965.

PEDRASSANI, D.; CAMARGO, F. R. Dioctofimose em cães: primeiro relato da ocorrência de casos no Distrito São Cristóvão, Três Barras – SC. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v.13. suplemento 1. p. 283. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG. 2004.

PEDRASSANI, D.; HOPPE, E. G. L., AVANCINI, N., NASCIMENTO, A. A.. Morphology of eggs of *Dioctophyme renale* Goeze, 1782 (Nematoda: Dioctophymatidae) and influences of temperature on development of first-stage larvae in the eggs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 15-19, 2009.

PEDRASSANI, D.; HOPPE, E. G. L.; TEBALDI, J. H.; NASCIMENTO, A. A. Ocorrência de L3 de *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Enoplida) em *Chaunus ictericus* (Anura: Bufonidae) no distrito de São Cristóvão, município de Três Barras, Santa Catarina. **In:** XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e do XI Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul. **Resumos...** Curitiba-PR, 2008c. CD - Rom.

PEDRASSANI, D.; NASCIMENTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Detention of IgG antibodies anti-*Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) in dogs of the São Cristóvão district, Três Barras county, Santa Catarina State for the Dot-ELISA. **In:** XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e do XI Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul. **Resumos...** Curitiba-PR, 2008a. CD - Rom.

PEDRASSANI, D.; NASCIMENTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Manutenção *in vitro* de formas adultas de *Dioctophyme renale* Goeze, 1782 (Nematoda:Enoplida) em meio de cultivo. **In:** XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e do XI Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul. **Resumos...** Curitiba-PR, 2008b. CD - Rom.

PELCZAR JÚNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2 ed. v. 1. São Paulo: MAKRON Books, 1996. 524p.

PEREIRA, B. J.; GIRARDELLI, G. L.; TRIVILIN, L.O.; LIMA, V. R.; NUNES, L. C.; MARTINS, I. V. F. Ocorrência de Dioctofimose em cães do município de Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo, Brasil, no período de maio a dezembro de 2004. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 123-125, 2006.

PEREIRA, M.G.. **Epidemiologia teoria e prática.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 596p.

PESENTI, T. C., KRÜGER, C., MASCARENHAS, C. S., MÜLLER, G. Ocorrência de *Dioctophyma renale* (GOEZE, 1782) em *Galictis cuja* no Rio Grande do sul. *In:* XVI Congresso de Iniciação Científica. **Resumos...** Pelotas, 2007. [Acesso em 03/2009]. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/cic/2007/cd/pdf/CB/CB_01594.pdf.

PINHÃO, R.. **Freqüência de nematódeos parasitas de trato digestório e pulmão de *Bufo ictericus* (Amphibia, Anura) da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005, 44p.

POPPI, F. P.; BARÇANTE, J. M. P.; BARÇANTE, T. A.. Primeiro relato de *Dioctophyma renale* parasitando o rim direito de um cão procedente do município de Poços de Caldas/MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v.13. suplemento 1. p. 274. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG. 2004.

PNUD-Brasil. **Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento**. Índice de Desenvolvimento Humano – Municipal. [Acesso em 09/2009]. Disponível em http://www.pnud.org.br/atlas/ranking/IDH-M%2091%2000%20Ranking%20decrescente%20(pelos%20dados%20de%202000).htm

RAPPETI, J. C. S.; TOGNOLI, G. K.; MARTINS, D. B.; SANTAROSA, I. M.; FESTUGATTO, R; LOPES, S. T. A.; PIPPI, N. L.; MAZZANTI, A. Dioctofimose assintomática em um cão: relato de caso. **MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos animais e animais de estimação**, Curitiba, v. 6, n.17, p.53-57, 2008.

REICHMANN, M. L. A. B; PINTO, H. B. F.; NUNES, V. F. P. **Vacinação contra a raiva de cães e gatos.** Manual 3, São Paulo: Instituto Pasteur, 1999.

REIS, L. S.; MARTUCCI, M. F.; BELLATINE, T.; CARVALHO, A. F.; VARZIM, F. L. S. D. Relato de Ocorrência de *Dioctophyma renale* em Mão pelada (*Procyon cancrivorous*) do Criatório em São João da Boa Vista, SP. *In:* XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Ribeirão Preto, SP, **Resumos**... p. 276, 2006.

RIVERO, J. C.; INOUE, Y.; MURAKAMI, N.; HORII, Y. Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v.64, n.6, p. 457-461, 2002.

ROCHA, U. F. R. G.; GRECHI, R. Parasitismo por *Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782) em "preguiça", *Choloepus didactylus* LINNAEUS, 1785. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica.** São Paulo, v. 3, p. 325-334, 1965.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia.** 6 ed. São Paulo: Manole, 2003. 481p.

SABAGH, L.T.; CARVALHO-E-SILVA, A.M.P.T. Feeding overlap in two sympatric species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) of the Atlantic Rain Forest. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.25, n.2, p.247-253, 2008.

SANT´ANA, L.; REBOUÇAS, I. *Dioctophyma renale* em cão. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 8-11, 1974.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus.** Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 144p. 2006.

SARDJONO, T. W.; PURMONO, B. B.; ISKANDAR, A.; GUNAWAN, A.. Dioctophymatosis renalis in humans: first case report from Indonesia. *In*: Proceedings of the 3rd ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology. Parasites: a Hiddesn Threat to Global Health, Thailand, **Proceedings…** v. 3, p. 90-93, 2008. [Acesso em 06/2009]. Disponível em http://www.ttat.thaigov.net.

SCHACHER, J. F.; FAUST, E. C. Occurrence of *Dioctophyma renale* in Louisiana, with remarks on the size of intertile eggs of this species. **The Journal of Parasitology,** Lawrence, v. 42, n. 5, p. 533-535, 1956.

SCHIMIDT, F. Contribuição para uma patologia veterinária no Rio Grande do Sul. **Egatea,** Porto Alegre, v.9, p. 245-254, 1924.

SLOSS, M. W.; ZAJAC, A. M.; KEMP, R. L. **Parasitologia clínica veterinária**. São Paulo: Manole. 1999. p. 94-97.

SOUZA JÚNIOR, F.L.; PÁDUA, E.B.. *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Nematoda, Dioctophymidae) em cães de rua da região de Taubaté (São Paulo, Brasil). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.6, n.1, p.7-10, 1977.

SUDRÉ, A. P. Caracterização imunológica de antígenos de *Strongyloides stercoralis*. 2007. 102f. **Dissertação** (Mestrado em Patologia – Área de concentração: Patologia clínica e análises clínicas - Curso de Pós-graduação em Patologia Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ).

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária.** 2 ed. São Paulo: Roca, 2004.

TIZARD, I. A. **Imunologia veterinária**. 5 ed. São Paulo: Roca, 1998. 545p.

TOLLITT, M.E. Case 2604 *Dioctophyme* Collet-Meygret, 1802 (Nematoda): Proposed confirmation of spelling (CIOMS Case No. 7). **Bulletin of Zoological Nomenclature**, Londres, v.44, p.237-239, 1987.

TORRES, R.; ALVES, A.; BORGES, A. G.; RAHAL, S. C.; SAKATE, M. Dioctofimíase canina. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 11, suplemento 1, p. 197, 2001.

TOWBIN, H.; STAEHLIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **The Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.

URANO, Z.; HASEGAWA, H.; KATSUMATA, T.; TORIYAMA, K.; AOKI, Y.. Dioctophymatid nematode larva found from human skin with creeping eruption. **Journal of Parasitology,** Lawrence, v. 87, n. 2, p. 462-465, 2001

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. p. 86 – 87.

VIEIRA NUNES, J. E.; ARAÚJO, G. A.; CAETANO, C. F.; SARMENTO, C.; RIOS, J. B. M.; TOALDO, R. C. Z.; CHAPON CORDEIRO, J.M.; SCHUCH, I. D. SCOPEL, D. *Dioctophyma renale* em fêmeas caninas – relato de casos. *In:* 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Gramado-RS, 2008. **Anais...** CD-rom

VIGNAU, M. L.; VENTURINI, L. M.; ROMERO, J. R.; EIRAS, D. F.; BASSO, W. U. **Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos.** Universidade de La Plata, Argentina, p.85-86, 2005

WOODHEAD, A. E. Life history cycle of the giant kidney worm, *Dioctophyma renale* (Nematoda), of man and many other mammals. **Transactions of the American Microscopical Society**, Columbus, v. 69, n. 1, p. 21 - 46, 1950.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for dog population management.** Geneva, 1990.

ZAKARIAN, B., SHAFAII -TONKABONI, J. Dioctophymosis in Iran. **British Veterinary Journal**, London, v. 128, p. 446-451, 1972.

**APÊNDICE 1.** Resultados dos soros de cães de Três Barras – SC (n=197), analisados pelo teste de ELISA indireto para pesquisa de IgG anti – *Dioctophyme renale.* Jaboticabal, SP, 2009.

| Soro | DO | Soro | DO | Soro | DO | Soro | DO | Soro | DO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1M | 0,254 | 41M | 0,161 | 81M | 0,217 | 4E | 0,208 | 44E | 0,266 |
| 2M | 0,538 | 42M | 0,513 | 82M | 0,254 | 5E | 0,268 | 45E | 0,108 |
| 3M | 0,072 | 43M | 0,442 | 83M | 0,126 | 6E | 0,178 | 46E | 0,238 |
| 4M | 0,094 | 44M | 0,174 | 84M | 0,150 | 7E | 0,221 | 47E | 0,051 |
| 5M | 0,313 | 45M | 0,204 | 85M | 0,300 | 8E | 0,196 | 48E | 0,182 |
| 6M | 0,121 | 46M | 0,236 | 86M | 0,664 | 9E | 0,190 | 49E | 0,252 |
| 7M | 0,116 | 47M | 0,157 | 87M | 0,315 | 10E | 0,304 | 50E | 0,261 |
| 8M | 0,530 | 48M | 0,221 | 88M | 0,170 | 11E | 0,473 | 51E | 0,290 |
| 9M | 0,152 | 49M | 0,280 | 89M | 0,264 | 12E | 0,108 | 52E | 0,509 |
| 10M | 0,179 | 50M | 0,265 | 90M | 0,315 | 13E | 0,552 | 53E | 0,127 |
| 11M | 0,251 | 51M | 0,208 | 91M | 0,609 | 14E | 0,164 | 54E | 0,391 |
| 12M | 0,502 | 52M | 0,200 | 92M | 0,280 | 15E | 0,434 | 55E | 0,177 |
| 13M | 0,477 | 53M | 0,195 | 93M179 | 0,144 | 16E | 0,589 | 56E | 0,443 |
| 14M | 0,100 | 54M | 0,047 | 94M180 | 0,145 | 17E | 0,213 | 57E | 0,286 |
| 15M | 0,440 | 55M | 0,277 | 95M181 | 0,137 | 18E | 0,213 | 58E | 0,267 |
| 16M | 0,256 | 56M | 0,247 | 96M182 | 0,243 | 19E | 0,216 | 59E | 0,463 |
| 17M | 0,213 | 57M | 0,317 | 97M183 | 0,200 | 20E | 0,494 | 60E | 0,062 |
| 18M | 0,217 | 58M | 0,151 | 98M184 | 0,292 | 21E | 0,212 | 61E | 0,177 |
| 19M | 0,283 | 59M | 0,240 | 99M185 | 0,181 | 22E | 0,089 | 62E | 0,136 |
| 20M | 0,229 | 60M | 0,051 | 100M186 | 0,261 | 23E | 0,344 | 63E | 0,233 |
| 21M | 0,347 | 61M | 0,125 | 101M187 | 0,143 | 24E | 0,469 | 64E | 0,184 |
| 22M | 0,240 | 62M | 0,442 | 102M188 | 0,223 | 25E | 0,232 | 65E | 0,122 |
| 23M | 0,358 | 63M | 0,162 | 103M189 | 0,169 | 26E | 0,576 | 66E | 0,126 |
| 24M | 0,427 | 64M | 0,176 | 104M190 | 0,344 | 27E | 0,227 | 67E | 0,137 |
| 25M | 0,367 | 65M | 0,124 | 105M191 | 0,252 | 28E | 0,126 | 68E | 0,258 |
| 26M | 0,410 | 66M | 0,204 | 106M192 | 0,245 | 29E | 0,355 | 69E | 0,271 |
| 27M | 0,538 | 67M | 0,186 | 107M193 | 0,120 | 30E | 0,189 | 70E | 0,150 |
| 28M | 0,371 | 68M | 0,191 | 108M194 | 0,195 | 31E | 0,196 | 71E | 0,164 |
| 29M | 0,629 | 69M | 0,137 | 109M195 | 0,187 | 32E | 0,096 | 72E | 0,243 |
| 30M | 0,272 | 70M | 0,186 | 110M196 | 0,284 | 33E | 0,260 | 73E | 0,301 |
| 31M | 0,243 | 71M | 0,193 | 111M197 | 0,136 | 34E | 0,163 | 74E | 0,283 |
| 32M | 0,289 | 72M | 0,042 | 112M198 | 0,150 | 35E | 0,093 | 75E | 0,220 |
| 33M | 0,241 | 73M | 0,212 | 113M | 0,153 | 36E | 0,265 | 76E | 0,199 |
| 34M | 0,590 | 74M | 0,120 | 114M | 0,132 | 37E | 0,373 | 77E | 0,166 |
| 35M | 0,508 | 75M | 0,126 | 115M | 0,123 | 38E | 0,152 | 78E | 0,269 |
| 36M | 0,426 | 76M | 0,126 | 116M | 0,128 | 39E | 0,224 | 79E | 0,194 |
| 37M | 0,560 | 77M | 0,165 | 117M | 0,179 | 40E | 0,244 | 80E | 0,206 |
| 38M | 0,438 | 78M | 0,185 | 1E | 0,210 | 41E | 0,222 | | |
| 39M | 0,236 | 79M | 0,141 | 2E | 0,154 | 42E | 0,355 | | |
| 40M | 0,406 | 80M | 0,153 | 3E | 0,043 | 43E | 0,258 | | |

DO = Densidade ótica