

## UTILIZAÇÃO DE KIT COMERCIAL ANIGEN RAPID *Dirofilaria immitis* Ag® EM COMPARAÇÃO COM A TÉCNICA DE KNOTT MODIFICADA NO DIAGNÓSTICO DA INCIDÊNCIA DE CÃES PORTADORES DA DIROFILARIOSE

[Use of the commercial kit ANIGEN rapid *Dirofilaria immitis* Ag® in comparison with the modified Knott technique for incidence in dogs with dirofilariosis]

Nailson Carvalho Batista<sup>2</sup>, Nicholas Morais Bezerra<sup>2</sup>, Ivana Cristina Nunes Gadelha<sup>2</sup>, Maiko Edigleyson de Oliveira Borges<sup>1</sup>, Sofia de Oliveira Cabral<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Vieira Dias<sup>3</sup>, Sidnei Miyoshi Sakamoto<sup>4</sup>, Carlos Iberê Alves Freitas<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária - UFERSA

<sup>2</sup>Médicos Veterinários autônomos.

<sup>3</sup>Técnico/ Fotógrafo autônomo.

<sup>4</sup>Prof. Adjunto – Departamento de Ciências Animais, UFERSA.

**RESUMO** - A incidência de animais positivos para *Dirofilaria immitis* nas cidades costeiras, a exemplo Natal, no Rio Grande do Norte vem aumentando, devido ser a mesma uma área de razoável incidência do mosquito *Aedes scapularis* (vetor da doença). A área examinada foi o quartel do Batalhão de Operações Especiais da Polícia Militar de Natal (BOPE), devido a sua localização próxima de mangue e área costeira. A importância da identificação de animais positivos é a não disseminação da doença, descaracterizando-a uma zoonose. Para isso, o objetivo deste trabalho foi demonstrar que o uso do kit comercial Anigen® Dirofilariose constitui num método imunocromatográfico de diagnóstico rápido e preciso, possibilitando iniciar assim um tratamento mais prematuro e com isto menor possibilidade de lesões cardíacas mais severas.

**Palavras-Chave:** Dirofilariose canina, diagnóstico, ANIGEN.

**ABSTRACT** - The incidence of positive animals for *Dirofilaria immitis* in the coastal cities such as Natal in Rio Grande do Norte is increasing due to be a reasonable area of incidence of *Aedes scapularis* mosquito (vector of the disease). The examined area was the headquarters of the Special Operations Battalion of the Military Police of Natal (BOPE), due to its location close to mangroves and coastal area. The importance of positive identification of animals is not spread the disease, the uncharacter zoonosis. For this, the objective of this study was to demonstrate that the use of commercial kit Anigen Dirofilariasis ® is an immunochromatographic method of diagnosis quickly and accurately, thereby enabling start a more premature and with this lesser possibility of more severe cardiac lesions.

**Keywords:** Canine dirofilariasis, diagnosis, ANIGEN.

### INTRODUÇÃO

Também conhecida como ‘doença do verme do coração’ a dirofilariose é uma grande preocupação para criadores, principalmente, de regiões costeiras de países tropicais e subtropicais e têm principalmente, os cães domésticos e silvestres como hospedeiros definitivos e outros mamíferos como hospedeiros eventuais. A doença é transmitida pelo mosquito *Aedes scapularis*, é rapidamente

disseminada e causa doenças cardíacas crônicas aos animais infectados.

Os vermes, na sua fase adulta, são longos de coloração esbranquiçada e apresentam dimorfismo sexual significativo, os machos medem de 12 a 20 cm e apresentam cauda espiralada e as fêmeas medem entre 25 e 31 cm e possuem cauda arredondada. O resultado do acasalamento desses vermes são as microfíliarias, que são as formas encontradas na circulação. Como todos os filarídeos,

\* Autor para correspondência. DCA/UFERSA, BR 110 Km 47, 59625-900, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: iberefreitas@yahoo.com.br.

estes vermes também necessita de um hospedeiro intermediário artrópode para a realização de seu ciclo.

A transmissão se dá quando as fêmeas do mosquito, que são hematófagas, picam o animal parasitado e ingerem o sangue do animal junto com as microfilárias, que foram eliminadas pela fêmea vivípara e estão na circulação periférica. No hospedeiro intermediário as microfilárias vão para o trato digestivo, atingindo a hemocele e logo após os tubos de Malpighi, onde irão se desenvolver para L2, e subsequentemente à L3 que já é a forma infectante, essa rompe a membrana dos tubos e migram até o aparelho bucal do hospedeiro intermediário, onde, quando este ao se alimentar de sangue de outro animal inoculam as larvas por ocasião da picada. No hospedeiro definitivo as larvas na circulação se desenvolvem à L4 que são as formas infectantes no animal que iniciam uma migração somática para o tórax. O desenvolvimento para L5 ou adultos jovens, dão predileção ao parasita pelo ventrículo direito do coração e às artérias pulmonares, onde permanecem até terminar seu desenvolvimento, atingindo sua maturidade sexual, acasalam e o ciclo se completa com a liberação das microfilárias na corrente sanguínea, que são encontradas aproximadamente seis meses após a infecção. Os mosquitos das espécies *Anopheles* e *Culex*, já foram citados como hospedeiros intermediários e transmissores das larvas L3 infectantes (Fortes, 1997).

Buscando uma maior eficiência na pesquisa do parasita temos que considerar dois aspectos, o primeiro que as microfilárias são mais facilmente encontradas na circulação do hospedeiro definitivo no início da noite pelo aumento da incidência de mosquitos e que o prazo mínimo para a migração da larva de *Dirofilaria immitis* após a infecção é de cinco meses, desta forma em cães com idade inferior a cinco meses não há como fazer os testes para dirofilariose, pois são muito jovens para serem infectados sob quaisquer circunstâncias (Brooks, 2001).

Existe uma série de exames laboratoriais para diagnosticar a doença tais como os utilizados para a pesquisa e identificação de microfilárias a exemplo do direto do sangue a fresco, Knott, Knott modificado, concentração em filtro, gradiente de densidade por centrifugação, gota espessa, testes para a pesquisa de anticorpos ou antígenos. Contudo, todos têm suas limitações, assim como sensibilidades.

Os animais parasitados, após oito ou nove meses da infecção, apresentam sinais clínicos clássicos, que

podem variar desde um quadro assintomático a cansaços quando submetido a exercícios físicos, tosse crônica, anorexia, perda de peso, anemia e trombocitopenia, podendo chegar a caquexia, ascite, dispnéia, intolerância total ao exercício, insuficiência cardíaca congestiva direita e morte. Sua gravidade é proporcional a carga parasitária, duração da infecção ou resposta do hospedeiro, caracterizando-se uma doença crônica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em um grupo de 19 animais de seis diferentes raças, Pastor Alemão(1), Pastor Belga(1), Rottweiler(6), Retriever do Labrador(4), Pit Bull(5) e Cocker Spaniel(2), ambos os sexos, com idade entre nove meses a quatro anos, de propriedade do Batalhão de Operações com Cães da Polícia Militar de Natal - Rio Grande do Norte. Foram elaboradas fichas individuais, com informações como, nome do animal, idade, sexo, raça, anamnese, parâmetros cardíaco e respiratório, temperatura.

Foi puncionada a veia cefálica, coletando 5 ml de sangue do animal, a coleta foi realizada no horário entre 17 e 23 horas para serem realizados dois testes para diagnóstico da Dirofilariose, um parasitológico e outro imunológico. Esse material foi acondicionado em frascos com anticoagulante (EDTA) e mantidos sob refrigeração para posterior processamento pelos métodos de Knott modificado (Newton & Wright, 1956) onde uma gota de soro foi colocada numa lamina, coberta por uma lamínula e visualizada direto ao microscópio óptico para identificação de microfilárias circulantes por observação em microscopia de luz com aumento de 100X com revisão de 100% das amostras, e um de imunodiagnóstico cromatográfico pelo kit Bioeasy ANIGEN RAPID *Dirofilaria immitis* Ag® (Bio Vet®, São Paulo-Brasil), onde uma gota de soro era processada e interpretada individualmente de acordo com as instruções do fabricante.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A pesquisa da existência da doença no BOPE se deu pelo fato de estarem domiciliados em local próximo de um mangue no aflente do rio Potengi constituindo assim uma área litorânea e ainda, próxima ao canil existe uma mata, com árvores e arbustos, muita umidade, apresentando-se como local de predileção para a proliferação de mosquitos. Isto se concretizou, pois foram encontrados indícios de que a região onde foram coletadas as amostras é

enzoótica para a *Dirofilariose* que possui distribuição cosmopolita que segundo Cirio (2005), apresenta-se como situação favorável o clima, devido às temperaturas elevadas e à alta precipitação pluviométrica, que por sua vez possuem relação direta e positiva com o desenvolvimento de espécies de Díptera. Apesar disto, segundo Fernandes e colaboradores (1999) quando compara seus resultados em um estudo realizados em Cuiabá com outros autores que também empregaram a mesma técnica diagnóstica em regiões também não-litorâneas encontram microfilárias de *D. immitis* e de *Dipetalonema reconditum*.

O horário adotado para a coleta de sangue se deu ao fato de ser o de maior incidência de mosquitos, onde as microfilárias migram para circulação periférica e são mais facilmente encontradas.

O método de Knott modificado (Newton & Wright, 1956) que se baseia em uma técnica de concentração foi escolhida pela facilidade pelo qual as microfilárias são observadas e, portanto melhor identificadas quanto a espécie baseada na motilidade e tamanho das microfilárias, bem como na morfologia das regiões anterior e posterior destas em acordo com o afirmado por Grieve e colaboradores (1983) e por ter custos reduzidos.

O estudo foi significativo, para observarmos os sinais clínicos relacionando-os aos animais infectados. Apesar de não apresentarem tosse crônica, que é um sinal característico da doença, os animais infectados apresentavam a auscultação uma leve disritmia cardíaca.

O exame parasitológico mostrou-se simples e de bons resultados, atentando para o fato de que não se utilizou corantes ou fixadores, que representou uma economia no procedimento. O teste de imunodiagnóstico pelo kit mostrou-se fácil, rápido e seguro (Fig. 1), sendo que em ambos os testes quando comparados entre si observou-se quase os mesmos resultados. A população canina investigada dos 19 animais estudados, três foram positivos para *Dirofilaria immitis*, uma taxa de 15% pelo teste de Knott, já com o kit de imunodiagnóstico tivemos quatro antígeno-positivos representando 21,1% de incidência na população.

Em um trabalho realizado de monitoramento da dirofilariose em cães da raça Pastor alemão por Lee e colaboradores (2000) de cinco regiões diferentes da Coréia do Sul através do teste de Knott modificado e de outro teste antígeno da Synbiotics, USA que o kit é mais preciso que a pesquisa de

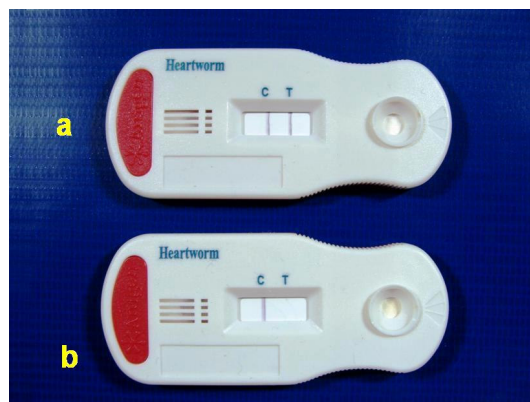


Figura 1. Resultados com o kit ANIGEN RAPID *Dirofilaria immitis* Ag® positivo (a) e negativo (b) no grupo teste

microfilárias circulantes, pois dos 36 animais detectados como antígeno-positivos, 66,7% deles foram negativos para microfilárias circulantes. Apesar de não ter sido encontrado uma discrepância tão acentuada como esta no grupo teste experimental de cães do BOPE esta ocorreu, o que é sugestivo que o kit poderia detectar mais prematuramente a doença, fato este que poderia favorecer um tratamento em fase mais inicial da doença antes de lesões mais graves decorrentes da evolução da patogenia.

Os dados são sugestivos de que a doença não tem predileção por uma raça específica, tomando como base que dos três animais infectados um era Rottweiler, outro Pit Bul e o terceiro Retriever do Labrador nem mesmo sexo ou idade na amostra utilizada.

## CONCLUSÕES

O kit comercial apresentou, nas condições experimentais utilizadas, uma acurada sensibilidade, podendo evidenciar animais portadores de dirofilariose oculta, não detectável pela técnica de Knott modificada.

## AGRADECIMENTOS

Ao Batalhão de Operações Especiais da Polícia Militar de Natal (BOPE) pela utilização de seus cães e a Bioeasy® (Bio Vet) por ceder o kit de testes Dirofilariose Ag.

## REFERÊNCIAS

- Ahid, S.M.M. De-Oliveira R.L. Saraiva L.Q. 1999. Dirofilariose canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: uma zoonose potencial. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 15(2):405-412.
- Almosny N.R.P. 2002. Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses: L.F. Livros de Veterinária Ltda., Rio de Janeiro, 135 p.
- Brooks, W.C. 2001. Diagnosis of heartworm disease. Capturado em 20 de maio 2008. Disponível na Internet: <http://www.VeterinaryPartner.com/Content.plx?P>
- Cirio, S.M. 2005. Epidemiologia e clínica de cães portadores de dirofilariose em espaços urbanos de município do litoral do Paraná e aspectos da histologia de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicidae). Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 155 p.
- Fernandes C.G.N. et al. 1999. Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, Estado de Mato Grosso – Brasil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., 36(5). Capturado em 16 de maio 2008. Online. Disponível na Internet: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-95961999000500007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000500007)
- Fortes E. 1997. Parasitologia Veterinária. 3ª ed. rev. e ampl. Ícone Editora, São Paulo, 686 p.
- Grieve R.B. et al. 1983. Epidemiology of canine heartworm infection. Epidemiologic Reviews, 5:220-46.
- Labarthe N.V. 1997. Dirofilariose canina: diagnóstico, prevenção e tratamento adulticida. Clin. Vet., v.2:10-16.
- Labarthe, N.V. et al. 1997. Description of the occurrence of canine dirofilariasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.92:47-51.
- Larsson M.H.M.A. 1990. Prevalência de microfilárias de *Dirofilaria immitis* em cães do Estado de São Paulo. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., v.27:183-186.
- Larsson M.H.M.A. et al. 1987. Contribuição ao diagnóstico clínico da dirofilariose canina. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. USP, 24:47-59.
- Larsson M.H.M.A. et al. 1998. New outbreak of dirofilariasis in São Paulo-Brazil. Anais Congreso de la Asociación Mundial de Medicina Veterinaria de Pequeños Animales, Buenos Aires, Argentina. AMMVPA. p.752.
- Lee K. J. Park G. M. Yong T. S. Im K. Jung S. H. Jeong N. Y. Lee W. Y. Yong, S.J. SHIN, K. C. 2000. The first Korean case of human pulmonary dirofilariasis. Yonsei Med., 41(2):285-288.
- Newton M.D. & Wright L.M. 1956. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. Journal of Parasitology, 42:246-58.