DIAGNÓSTICO DE DIROFILARIOSE OCULTA PELO TESTE DE ELISA, EM CÃES DO ESTADO DE SÃO PAULO

MARIA HELENA MATIKO AKAO LARSSON
Professor Associado

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

MARGARETH PRETEROTE
Clínico Autônomo

REGINA MEIKO SAKATA MIRANDOLA
Técnico Especializado
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

LARSSON, M.H.M.A.; PRETEROTE, M.; MIRANDOLA, R.M.S.
Diagnóstico de dirofilariose oculta pelo teste de ELISA, em cães do Estado de São Paulo. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.29, n.1, p.93-6, 1992.

RESUMO: A dirofilariose oculta constitui-se num grande problema diagnóstico e pode estar relacionada a: a) infecções pré-patentes; b) infecções causadas por vermes de um único sexo; c) esterilidade dos parasitas devido à idade ou induzida por ação de drogas; d) resposta imune mediada. Avaliou-se, no presente trabalho, a prevalência de dirofilariose em cães do Estado de São Paulo, através do teste de ELISA (CITE^R Semi-QuantTM Canine Heartworm Antigen Test Kit), bem como se tentou caracterizar a causa da ausência de microfilaremia circulante, com auxílio de exames subsidiários. De 244 soros examinados, 35 (14,34%) mostraram-se positivos. Destes, 20 apresentaram, além do teste de ELISA positivo, uma ou mais alterações (radiográficas/eletrocardiográficas), compatíveis com o diagnóstico de dirofilariose canina; e, nos demais 15 animais, assintomáticos, também soropositivos pelo teste de ELISA, descartou-se a forma de infecção pré-patente, pois haviam sido expostos ao risco da infecção há mais de 6 meses, e também a esterilidade dos parasitas conseqüentemente à ação de drogas.

UNITERMOS: *Dirofilaria immitis*; Dirofilariase, cães; Diagnóstico; São Paulo

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de dirofilariose canina baseia-se, usualmente, na detecção de microfilarías de *Dirofilaria immitis* no sangue periférico (KNIGHT¹², 1983). Entretanto, a revisão da literatura específica revela uma prevalência de 10 a 67% de casos de dirofilariose oculta, isto é, casos em que não é possível demonstrar a presença de microfilarías circulantes (WONG et al.²⁸, 1973; OTTO¹⁸, 1978; LARSSON et al.¹⁴, 1987). Esta condição de ausência de microfilaremia periférica, que se constitui num grande problema diagnóstico, pode estar relacionada a: a) infecções pré-patentes; b) infecções por verme de um único sexo; c) esterilidade dos parasitas devido à idade ou induzida por ação de drogas; d) resposta imunomediada (RAWLINGS et al.¹⁹, 1982; WAGNER et al.²⁶, 1983; CALVERT; RAWLINGS⁴, 1986).

Clinicamente, a dirofilariose canina encontra-se associada a sinais clínicos variados, porém, nenhum patognomônico do processo. Assim, frequentemente a infestação por *D. immitis* está relacionada com eosinofilia e/ou basofilia (WONG et al.²⁸, 1973; GLIKMAN et al.⁷, 1984; LARSSON, et al.¹⁴, 1987). Determinadas anormalidades radiográficas também são sugestivas do parasitismo por *D. immitis* (RAWLINGS; LEWIS²⁰, 1977; RAWLINGS et al.²², 1978; ALLAN¹, 1981; LARSSON et al.¹⁴, 1987). Assim, resta, como possibilidade diagnóstica nos casos de dirofilariose oculta, a realização de testes imunológicos, a exemplo da hemaglutinação indireta (HAYASAKI¹⁰, 1981), da imunofluorescência indireta (WONG; SUTER²⁷, 1979; CALVERT; RAWLINGS⁴, 1986) e daquele denominado teste de ELISA (GRIEVE et al.⁹, 1981; KELLY¹¹, 1983; SCHOLTENS; PATTON²³, 1983; WAGNER et al.²⁶, 1983; ATWELL et al.², 1988; LEVINE et al.¹⁵, 1988).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência da dirofilariose oculta em cães do Estado de São Paulo, através do teste de ELISA (CITE^R Semi-QuantTM Canine Heartworm Antigen Test Kit) bem como tentar caracterizar a causa da ausência de microfilaremia circulante com auxílio de exames subsidiários.

MATERIAL E MÉTODO

A amostragem foi constituída por 244 soros de cães, atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, no período de 20.10.1989 a 30.06.1990, expostos ao risco da infecção e negativos na pesquisa de microfilarías circulantes.

Além da anamnese e do exame físico detalhados realizaram-se, também, hemograma completo e exame ele-

trocárdiográfico de todos os animais; alguns ainda foram submetidos ao exame radiográfico de tórax.

Na anamnese inquiriu-se a respeito dos antecedentes mórbidos, início dos sintomas e/ou sinais, decurso do processo, funcionamento de todos os sistemas orgânicos, manejo higiênico-dietético e instituição de tratamento anterior. No item relativo aos antecedentes, deu-se ênfase às informações sobre a procedência do animal ou a sua permanência breve ou prolongada, em locais em que a dirofilariose grassa de forma endêmica.

O exame físico consistiu de tomada das frequências cardíaca e respiratória, assim como da temperatura interna na ampola retal e, em especial, do exame do tórax por meio da inspeção, palpação, percussão dígito-digital e auscultação indireta; procedeu-se também à palpação e percussão abdominais.

A pesquisa de microfíliarias circulantes, pelo método de Knott modificado, foi realizada segundo NEWTON; WRIGHT¹⁷ (1956); o hemograma, conforme preconiza BIRGEL³ (1982); o exame eletrocardiográfico, de acordo com TILLEY²⁴ (1985) e EDWARDS⁶ (1987) e o exame radiográfico, segundo DE MARTIN; IWASAKI⁵ (1976).

O teste de ELISA foi realizado com "Kit" comercial (CITE^R Semi-QuantTM Canine Heartworm Antigen Test Kit), gentilmente cedido pela Merck-Sharp e Dohme.

RESULTADOS

Das 244 amostras séricas examinadas pelo teste de ELISA, trinta e cinco (14,34%) revelaram-se positivas para presença de antígeno de *D. immitis*.

Computando e analisando as informações obtidas por meio da anamnese, observou-se que a maioria dos casos 30 (85,71%), freqüentemente ou já havia estado em zona endêmica (Litoral do Estado de São Paulo) e que cinco (14,29%) que nunca haviam deixado o domicílio em zona urbana não litorânea, também eram soropositivos, sendo quatro residentes na Grande São Paulo e um em São Bernardo do Campo.

Os exames complementares realizados nos 35 animais soropositivos mostraram alterações compatíveis com a parasitose cardíaca, na maioria dos casos (20 ou 57,14%). Observaram-se anormalidades radiográficas (aumento ventricular direito e/ou aumento do tronco das aa. pulmonares e/ou aumento do diâmetro das aa. pulmonares lobares caudais e/ou aumento do interstício pulmonar) em 11 cães (55,0%); as alterações hematológicas, traduzidas principalmente por eosinofilia e/ou basofilia, estiveram presentes em 10 casos (50,0%); as alterações eletrocardiográficas (aumento ventricular direito, desvio do eixo cardíaco no plano frontal para

a direita, intra desnível do segmento ST) foram observadas em cinco animais (25,0%).

Dos referidos 35 animais soropositivos pelo teste ELISA, 20 (57,14%) apresentavam uma ou mais alterações e 15 (42,86%) não apresentaram nenhuma anormalidade passível de ser detectada pelos exames subsidiários utilizados e, coincidentemente, nunca haviam sido submetidos a qualquer tipo de medicação, sendo que todos (15) haviam sido expostos ao risco da infecção há mais de seis meses.

DISCUSSÃO

A prevalência de 14,34% de casos de dirofilariose oculta em cães, detectada pela prova imunoenzimática (ELISA), é compatível com as observações de WAGNER et al.²⁶ (1983), KELLY et al.¹¹ (1983) e GRIEVE et al.⁸ (1986), respectivamente, da ordem de 11,53%; 11,5% e 16,66%; por outro lado, está muito aquém daquelas obtidas por UTRSKA²⁵ (1986) e LEVINE et al.¹⁵ (1988), respectivamente, da ordem de 41,8 - 42,6%, 42,0%.

As observações anteriores de LARSSON¹³ (1990) foram reconfirmadas no presente estudo, em que se caracterizou, novamente, tanto o Litoral do Estado de São Paulo como a cidade de São Paulo, como zonas endêmicas de dirofilariose canina, acrescentando-se a estas, ainda, o Município de São Bernardo do Campo. Todos os casos positivos da Grande São Paulo e aquele de São Bernardo do Campo residiam em zonas perilacustres.

Corroborando achados relatados por RAWLINGS; LEWIS²⁰, 1977; RAWLINGS et al.²², 1978; ALLAN¹, 1981; LARSSON et al.¹⁴, 1987, todas as alterações radiográficas (aumento ventricular direito e/ou aumento do tronco das aa. pulmonares e/ou aumento do diâmetro das aa. pulmonares lobares caudais e/ou densificação difusa e reticular do interstício pulmonar dos lobos diafragmáticos), observadas em 11 (55,0%) animais, são compatíveis com o diagnóstico da parasitose cardíaca.

No que tange à eosinofilia e/ou basofilia ora detectadas em 10 cães (50,0%), elas representam as anormalidades hematológicas mais comumente associadas à dirofilariose canina; contudo, a eosinofilia também pode ser detectada em outros processos, especialmente as parasitoses intestinais. Outrossim, a basofilia parece estar mais especificamente relacionada à parasitose por *D. immitis*, mas nem todos os animais acometidos apresentam a referida alteração hematológica (GLICKMAN et al.⁷, 1984; LARSSON et al.¹⁴, 1987).

Somente cinco (25,0%) animais apresentaram alterações eletrocardiográficas compatíveis com dirofilariose, o que deve estar ligado ao fato de que as mesmas surgem, mais tardiamente, na evolução do processo (RAWLINGS; LEWIS²⁰, 1977). O mesmo não pode

Diagnóstico de dirofilariose oculta pelo teste de ELISA, em cães...

ser afirmado no que tange às alterações radiográficas que, segundo RAWLINGS et al.²¹ (1981), podem ser detectadas a partir do quinto mês de infecção.

Segundo UTROSKA²⁵ (1986), que realizou pesquisa comparando o método de Knott modificado com dois testes comerciais (ELISA), este tipo de prova imunodiagnóstica é útil, mas não infalível e, na opinião de MARTIN; COLLINS¹⁶ (1985), o resultado do teste de ELISA deve sempre ser analisado conjuntamente com outros dados clínicos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio da metodologia empregada no presente estudo permitem concluir:

- 1) que os 20 animais que apresentaram, além do teste de ELISA positivo, uma ou mais alterações compatíveis com o diagnóstico de dirofilariose, realmente eram portadores de parasitose cardíaca;
- 2) que nenhum dos 15 animais, assintomáticos, soropositivos pelo teste de ELISA, apresentava a forma de infecção pré-patente, pois todos haviam sido expostos ao risco da infecção há mais de seis meses, tempo necessário e suficiente para a detecção de microfílaras no sangue periférico e, como nenhum deles tivesse sido submetido a qualquer tipo de tratamento, a ausência de microfílaras circulante não pôde ser creditada à esterilidade dos parasitas consequente à ação de drogas;
- 3) que é importante e indispensável o uso de testes imunodiagnósticos, como ELISA, quando se trata do diagnóstico de dirofilariose canina, para que possam conhecer os casos ocultos, isto é, aqueles não detectados pelos meios usuais.

LARSSON, M.H.M.A.; PRETEROTE, M.; MIRANDOLA, R.M.S. Diagnosis of canine dirofilariosis, by ELISA test, in the State of São Paulo. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.29, n.1, p.93-6, 1992.

SUMMARY: The occult dirofilariosis is considered a great diagnostic problem and may be related to: a) pre-patent infections; b) infections caused by worms of one only sex; c) parasites sterility due to the age or induced by drugs action; d) immune mediate response. The present study estimated the prevalence of the dirofilariosis in dogs in São Paulo State by means of the ELISA test (CITE^R Semi-QuantTM Canine Heartworm Antigen Test Kit) as well as it tried to characterize the cause of the circulating microfilaraemia absence

using subsidiary exams. From 244 examined sera, 35 (14.34%) showed to be positive. From these, 20 presented one or more alternations (radiographic/haematologic/eletrocardiographic), besides the positive ELISA test, which were compatible with dirofilariosis diagnosis. In the 15 animals left, which were assintomatic and seropositive by means of the ELISA test, no pre-patent infection was possible in spite of being to the infection risk for 6 months. Also the parasite sterility in consequence to drugs action was no observed.

UNITERMS: *Dirofilana immitis*; Dirofilariosis in dogs; Diagnosis; São Paulo, Brazil

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-ALLAN, G. Radiology of canine heartworm disease. *Aust. vet. Pract.*, v.11, p.196-8, 1981.
- 02-ATWELL, R.B.; SHERIDAN, A.B.; BALDOCK, F.C. An evaluation of the Dirochek test for detection of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Aust. vet. J.*, v.65, p.161-2, 1988.
- 03-BIRGEL, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA. *Patologia clínica veterinária*. São Paulo, 1982. p.2-50.
- 04-CALVERT, C.A.; RAWLINGS, C.A. Therapy of canine heartworm disease. In: KIRK, R.W., ed. *Veterinary current therapy*. 9.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1986. p.406-19.
- 05-DE MARTIN, B.W.; IWASAKI, M. *Noções de radiodiagnóstico veterinário*. São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 1976. /Apostila/
- 06-EDWARDS, N.J. *Bolton's handbook of canine and feline electrocardiography*. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1987.
- 07-GLICKMAN, L.T.; GRIEVE, R.B.; BREITSCHWERT, E.B. Serologic patterns of canine heartworm (*D. immitis*) infection. *Amer. J. vet. Res.*, v.45, p.1178-83, 1984.
- 08-GRIEVE, R.B.; GLICKMAN, L.T.; BATER, A.K.; MIKA-GRIEVE, M.; THOMAS, C.; PATRONEK, G.J. *Canine Dirofilaria immitis* infection in a hyperenzootic area: examination by parasitologic findings at necropsy

and by two serodiagnostic methods. *Amer. J. vet. Res.*, v.47, p.329-32, 1986.

09-GRIEVE, R.B.; MIKA-JOHNSON, M.; JACOBSON, R.H. Enzyme linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Amer. J. vet. Res.*, v.42, p.66-9, 1981.

10-HAYASAKI, M. Indirect hemagglutination test for diagnosis of canine filariasis. *Jap. J. vet. Sci.*, v.43, p.21-6, 1981.

11-KELLY, S.T.; PRATT, S.E.; WARNER, C.A.; CORWIN, R.M. Diagnosis of occult (amicrofilaremic) heartworm infection using ELISA technique for random source dogs selected for medical research. *Lab. anim. Sci.*, v.33, p.507, 1983.

12-KNIGHT, D.H. Heartworm disease. In: ETTINGER, S.J. *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of dogs and cats*. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1983. v.1, p.1097-124.

13-LARSSON, M.H.M.A. Prevalência de microfilárias de *Dirofilaria immitis* em cães do Estado de São Paulo. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, v.27, p.183-6, 1990.

14-LARSSON, M.H.M.A.; IWASAKI, M.; FERNANDES FILHO, A.; D'ERRICO, A.A.; OGASSAWARA, S.; DUTRA, L.F. Contribuição ao diagnóstico clínico da dirofilariose canina. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v.24, p.47-59, 1987.

15-LEVINE, J.F.; FOX, D.S.; SNOWDEN, K.F.; GREENE, R.T.; KENNEDY, K.R.; CHILDRESS, K.K. Validity of Filarochek^(R) test for detection of *Dirofilaria immitis* infections in dogs. *J. Amer. Anim. Hosp. Ass.*, v.24, p.327-331, 1988.

16-MARTIN, T.E.; COLLINS, G.H. Testing heartworm disease in dogs. *Canad. vet. J.*, v.26, p.58, 1985.

17-NEWTON, M.D.; WRIGHT, L.M. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. *J. Parasit.*, v.42, p.246-58, 1956.

18-OTTO, G.F. The significance of microfilaremia in the diagnosis of heartworm infection. In: HEARTWORM SYMPOSIUM, 1977. *Proceedings*. Bonner Springs, Veterinary Medicine Publishing, 1978. p.22.

19-RAWLINGS, C.A.; DAWE, D.L.; MCCALL, J.W.; KEITH, J.C.; PRESTWOOD, A.K. Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, v.180, p.1323-6, 1982.

20-RAWLINGS, C.A.; LEWIS, R.E. Right ventricular enlargement in heartworm disease. *Amer. J. vet. Res.*, v.38, p.1801-5, 1977.

21-RAWLINGS, C.A.; LOSONSKY, J.M.; LEWIS, R.E.; MCCALL, J.W. Development and resolution of radiographic lesions in canine heartworm disease. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, v. 178, p.1172-7, 1981.

22-RAWLINGS, C.A.; MCCALL, J.W.; LEWIS, R.E. The response of the canine's heart and lungs to *Dirofilaria immitis*. *J. Amer. Anim. Hosp. Ass.*, v.14, p.36-9, 1978.

23-SCHOLTENS, R.G.; PATTON, S.P. Evaluation of an enzymelinked immunosorbent assay for occult dirofilariasis in a population of naturally exposed dogs. *Amer. J. vet. Res.*, v.44, p.861-4, 1983.

24-TILLEY, L.P. *Essentials of canine and feline electrocardiography*. 2.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1985.

25-UTROSKA, B. A heartworm survey and concurrent comparison of in-house diagnostic tests. *Can. Pract.*, v.13, n.3, p.20-4, 29-30, 1986.

26-WAGNER, C.A.; PRATT, S.E.; CORWIN, R.M. A new test for diagnosis of canine heartworm infection. *Vet. med. Res.*, v.4, n.3/4, p.8-9, 1983.

27-WONG, M.M.; SUTER, P.F. Indirect fluorescent antibody test in occult dirofilariasis. *Amer. J. vet. Res.*, v.40, p.414-20, 1979.

28-WONG, M.M.; SUTER, P.F.; RHODE, E.A.; GUEST, M.F. Dirofilariasis without circulating microfilariae: a problem in diagnosis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, v.163, p.133-9, 1973.

Recebido para publicação em 19/08/91

Aprovado para publicação em 21/11/91